

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
(CIPHARMA)

BÁRBARA LETÍCIA GONÇALVES DE ASSIS

EXPRESSÃO DE pRB, ki-67 E DA ONCOPROTEÍNA E7 DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO NAS LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS
E NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE INVASOR

Ouro Preto – MG
Fevereiro de 2019

BÁRBARA LETÍCIA GONÇALVES DE ASSIS

**EXPRESSÃO DE pRB, ki-67 E DA ONCOPROTEÍNA E7 DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO NAS LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS
E NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE INVASOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte das exigências para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Alves Lima

**OURO PRETO – MG
2019**

A848e

Assis, Bárbara Letícia Gonçalves de.

Expressão de pRb, ki-67 e da oncoproteína E7 do papilomavirus humano nas lesões intraepiteliais cervicais e no carcinoma epidermoide invasor [manuscrito]

/ Bárbara Letícia Gonçalves de Assis. - 2019.

vi, 73f.: il.: color; grafs; tabs; Fluxograma.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angélica Alves Lima.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Colo uterino - Câncer. 2. Papilomavírus. 3. Biomarcadores. I. Lima, Angélica Alves. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616-006.52



UFOP
Universidade Federal
de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
ESCOLA DE FARMÁCIA



LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 152ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **Bárbara Letícia Gonçalves de Assis**, com a defesa da dissertação intitulada: “Expressão de pRB, ki-67 e da Oncoproteína E7 do Papilomavirus Humano nas lesões intraepiteliais cervicais e no carcinoma epidermoide invasor”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 28 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino
UFMG

Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
UFOP

Profa. Dra. Angélica Alves Lima
UFOP

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Dircéia e Ney Airon,
pelo incentivo e apoio sempre*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à Nossa Senhora da Piedade a quem dedico minha devoção.

À minha família, meus pais e meu irmão, por acreditarem em mim e pelo apoio incondicional nas minhas decisões.

Às amigas e amigos por proporcionarem mais leveza aos meus dias.

À minha professora e orientadora, Angélica Alves Lima, pela paciência na condução dessa pesquisa, pelos ensinamentos, por acreditar no meu potencial e me permitir crescer no meio acadêmico.

Às colegas de trabalho, Nayara Nascimento Toledo Silva, Ana Carolina Silva Santos, Laura Alves Cota e Maria Clara Batista, pelo companheirismo e troca de conhecimentos.

À colega Bruna Pitol que me ensinou muito do que sei sobre minha área de pesquisa.

Ao Laboratório Tafuri e Dr. Alexandre Tafuri por nos fornecerem as amostras necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

A todas as mulheres que, direta ou indiretamente, permitiram que fosse possível concluir essa pesquisa.

À cidade de Ouro Preto por ser meu segundo lar.

À UFOP, à Escola de Farmácia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Cipharma).

À CAPES, Fapemig e CNPq pelo apoio financeiro.

*A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original*

Albert Einstein

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	1
2) OBJETIVOS	3
2.1) Geral.....	3
2.2) Específicos.....	3
3) REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1) Classificação e Genoma do HPV.....	5
3.2) Ciclo de vida do HPV e desenvolvimento do câncer cervical	7
3.3) Diagnóstico do Câncer Cervical	12
3.4) Biomarcadores	17
4) MÉTODOS.....	20
4.1) Amostragem	20
4.2) Padronização IHQ: teste de diluição dos anticorpos	21
4.3) Imunoistoquímica (IHQ).....	23
4.4) Análises moleculares do DNA do HPV	25
4.4.1 HPV de alto risco (HR-HPV).....	25
4.5) Análise estatística	28
5) RESULTADOS	29
5.1) Expressão IHQ de pRb, p53 e p16 nas lesões intraepiteliais cervicais e no CEI.....	29
5.2) Expressão IHQ de Ki-67 e PCNA nas lesões intraepiteliais cervicais e no CEI.....	31
5.3) Análise do Papilomavírus Humano: L1/HPV, E7/HPV e HR-HPV	32
5.4) Análise da expressão de proteínas de ciclo celular e de proliferação e sua relação com a infecção por HPV e o com o diagnóstico histopatológico	39
5.5) Análise do desempenho diagnóstico dos testes moleculares e imunoistoquímicos das proteínas de ciclo celular, de proliferação e virais.	41
6) DISCUSSÃO	43
7) CONCLUSÃO.....	52
8) REFERÊNCIAS	53
9) ANEXOS.....	69

RESUMO: O câncer cervical é uma das doenças mais frequentes que acometem a população feminina. O Papilomavírus Humano de alto risco oncogênico (HR-HPV), principal fator de risco do câncer cervical, interfere no ciclo celular do hospedeiro levando à desregulação e progressão para lesões neoplásicas. Esta interferência pode levar a indicação de marcadores úteis no prognóstico e no diagnóstico da doença. A maioria dos marcadores que vêm sendo investigados são proteínas virais, de ciclo celular e de proliferação. Assim, neste estudo foi avaliada a expressão imunoistoquímica das proteínas pRb, Ki-67 e E7-HPV nas lesões intraepiteliais cervicais e no carcinoma epidermoide invasor, correlacionando-as com a infecção por HR-HPV e a expressão imunoistoquímica de p16, p53, PCNA e L1/HPV. O trabalho foi realizado com 150 amostras de biópsias cervicais, distribuídas em Cervicite (C), Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) de graus 1, 2 e 3 e Carcinoma Epidermoide Invasor (CEI). A expressão das proteínas foi avaliada pela técnica de imunoistoquímica utilizando anticorpos monoclonais anti-pRb, anti-ki-67 e anti-E7-HPV16. A pesquisa de HR-HPV foi feita por PCR tempo real que possibilitou a detecção de 14 tipos virais de alto risco oncogênico (HR-HPV). Análise inicial mostrou que as proteínas de ciclo celular, de proliferação e do HPV apresentaram associação com o grau da lesão ($p < 0,05$), sendo pRb, p53 e L1/HPV menos expressas nas lesões mais graves (NIC3/CEI) enquanto ki-67, PCNA e p16 foram mais expressas nessas lesões. Em relação à infecção viral, HR-HPV foi detectado em 61,3% das amostras, com predomínio de HPV 16 em NIC3/CEI e de outros tipos virais de alto risco em NIC1/NIC2. HPV 18 foi detectado apenas em amostras NIC3/CEI. A presença de HR-HPV foi associada ao diagnóstico histopatológico. Foi observada alta positividade de HPV em todas as amostras e maior frequência de HR-HPV nas lesões mais graves. Os resultados mostraram menor expressão de E7/HPV em NIC2 e CEI. Nas lesões cervicais, independente do grau, houve predomínio de E7+/HRHPV+ (NIC1 = 50,0%; NIC2 = 36,7% e NIC3 = 60,0%), exceto em CEI onde o padrão E7-/HRHPV+ foi o mais presente (43,3%). Em cervicite os padrões mais encontrados foram E7-/HRHPV- (30,8%) e E7+/HRHPV- (57,7%). Na análise de associação das proteínas de ciclo celular com o diagnóstico histopatológico foi observada significativa diminuição da expressão de pRb e aumento de p16 nas lesões mais graves nas amostras positivas para HR-HPV e E7/HPV. A avaliação do desempenho diagnóstico apontou que a associação do teste de pRb com p16 (A: NIC1+ = 87,0%) ou com HR-HPV (A: NIC1+ = 80,8%) tiveram as melhores acurácias para diferenciar lesões NIC1+. A associação do teste de pRb com o de L1/HPV (A: NIC2+ = 80,1%) apresentou desempenho satisfatório na avaliação de NIC2+. Os resultados sugerem que a análise de pRb, p16 e HR-HPV, isolados ou associados, podem ser úteis como possíveis marcadores auxiliando na diferenciação dos graus das lesões intraepiteliais cervicais.

Palavras-chave: câncer cervical, HPV, biomarcadores, pRb, ki-67, E7/HPV, imunoistoquímica.

ABSTRACT: Cervical cancer is one of the most common diseases which affecting female population. Persistent infection of high-risk HPVs (HR-HPV), main risk factor to development of cervical cancer, interferes in host cell cycle leading to deregulation and progression to neoplastic lesions. These alterations can lead to indication of useful markers in prognosis and diagnosis of disease. Most of markers have been investigated are viral oncoprotein, cell cycle and proliferation proteins. Thus, in this study the immunohistochemical expression of pRb, Ki-67 and E7-HPV proteins in cervical intraepithelial lesions and carcinoma was correlated with HR-HPV infection and immunohistochemical expression of p16, p53, PCNA and L1 / HPV. This research was carried out with 150 cervical biopsy specimens, distributed in Cervicitis (C), Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) of grades 1, 2 and 3 and Invasive Cervical Carcinoma (ICC). Protein expression was assessed by immunohistochemistry using anti-pRb, anti-ki-67 and anti-E7-HPV16 monoclonal antibodies. HR-HPV DNA was performed by real-time PCR that enabled detection of 14 high-risk oncogenic viral types (HR-HPV). Initial analysis showed that cell cycle, proliferation and HPV proteins were associated with lesion grade ($p < 0.05$), with pRb, p53 and L1/HPV less expressed in most severe lesions (CIN3/ICC) while ki-67, p16 and PCNA were more expressed in these lesions. Regarding viral infection, HR-HPV was detected in 61.3% of samples, with a predominance of HPV 16 in CIN3/ICC and other high-risk viral types in CIN1/CIN2. HPV 18 was detected only in CIN3/ICC samples. Presence of HR-HPV was associated with histopathological diagnosis. High HPV positivity was observed in all samples and a higher HR-HPV frequency in more severe lesions. Results showed lower expression of E7/HPV in CIN2 and ICC. In cervical lesions, regardless of degree, there was a predominance of E7+/HRHPV+ (CIN1 = 50.0%, CIN2 = 36.7%, CIN3 = 60.0%), except in ICC where E7+/HRHPV- pattern was more present (43.3%). In cervicitis, the most frequent patterns were E7-/HRHPV- (30.8%) and E7+/HRHPV- (57.7%). In analysis of association of cell cycle proteins with histopathological diagnosis was observed a significant decrease in pRb expression and increase of p16 in most severe lesions in HR-HPV and E7/HPV positive samples. Diagnosis performance assessment showed that association of pRb test with p16 (A: CIN1+ = 87.0%) or with HR-HPV (A: CIN1 + = 80.8%) had the best accuracy to differentiate CIN1+ lesions. Association of pRb test with L1/HPV test (A: CIN2 + = 80.1%) presented satisfactory performance to evaluate CIN2+ lesions. These results suggest that analysis of pRb, p16, and HR-HPV, isolated or associated, may be useful as possible markers support in differentiation of degrees of cervical intraepithelial lesions.

Key words: cervical cancer, HPV, biomarkers, pRb, ki-67, E7/HPV, immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Modelo Tridimensional do HPV e Genoma do α -HPV	6
FIGURA 2: Carcinogênese cervical: história natural da infecção viral e alterações celulares que ocorrem paralelamente à infecção pelo HPV	9
FIGURA 3: (A) Principais mecanismos de ação das oncoproteínas E6 e E7 dos HR-HPVs sobre algumas proteínas do hospedeiro durante a integração do DNA viral. (B) Efeitos carcinogênicos resultantes das ações das oncoproteínas E6 e E7 nos seus alvos celulares.	10
FIGURA 4: Representação histológica das lesões NIC e carcinoma invasivo.....	16
FIGURA 5: Distribuição das amostras de acordo com o diagnóstico histopatológico e as análises realizadas.....	20
FIGURA 6: Diluições testadas para os anticorpos utilizados na IHQ	22
FIGURA 7: Padrão de marcação observado na imunoistoquímica utilizando os anticorpos anti-pRb, anti-p53 e anti-p16.....	31
FIGURA 8: Padrão de marcação observado na imunoistoquímica utilizando os anticorpos anti- anti-Ki67 e anti-PCNA.....	33
FIGURA 9: Padrão de marcação observado na imunoistoquímica utilizando os anticorpos anti-E7HPV e anti L1/HPV.....	35
FIGURA 10: Representação gráfica dos resultados da pesquisa de HR-HPV pela técnica de PCR tempo real de acordo com o diagnóstico histopatológico.....	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Principais genótipos do HPV classificados de acordo com sua oncogenicidade e doença associada.....	5
TABELA 2: Funções das proteínas do Papilomavirus Humano.....	8
TABELA 3: Sistemas de classificação das lesões cervicais.....	15
TABELA 4: Características técnicas dos anticorpos e condições para execução da metodologia de IHQ.....	23
TABELA 5: Condições da PCR tempo real definidas pelo fabricante.....	26
TABELA 6: Características dos detectores/sondas fluorescentes.....	26
TABELA 7: Interpretação dos resultados.....	27
TABELA 8: Sequência dos iniciadores utilizados na metodologia de PCR convencional.....	28
TABELA 9: Expressão das proteínas de ciclo celular pRb, p53 e p16 de acordo com o diagnóstico histopatológico.....	29
TABELA 10: Expressão das proteínas de proliferação Ki-67 e PCNA de acordo com o diagnóstico histopatológico.....	32
TABELA 11: Expressão das proteínas do HPV de acordo com o diagnóstico histopatológico.....	34
TABELA 12: Frequência de amostras com resultado positivo para a pesquisa de proteínas e de DNA do HPV por técnicas imunoistoquímicas e moleculares em relação ao diagnóstico histopatológico.....	37
TABELA 13: Análise da expressão de E7/HPV e da presença ou não de HR-HPV de acordo com o diagnóstico histopatológico.....	38
TABELA 14: Expressão das proteínas de ciclo celular e de proliferação de acordo com a infecção por HR-HPV e IHQ de E7/HPV.....	39
TABELA 15: Expressão das proteínas de ciclo celular, de proliferação e L1-HPV de acordo com a infecção por HR-HPV, IHQ de E7/HPV e o diagnóstico histopatológico.....	40
TABELA 16: Análise da eficiência diagnóstica dos testes moleculares e imunoistoquímicos das proteínas de ciclo celular, de proliferação e virais, isoladas e/ou em associação.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIS: Adenocarcinoma *in situ*
C: Cervicite
CC: Câncer Cervical
CDK: *Cyclin Dependent Kinase* (Quinase Dependente de Ciclina)
CEI: Carcinoma Epidermoide Invasor
DNA: Ácido Desoxirribonucléico
DNA pol: DNA polimerase
E: *Early* (precoce)
E2F: Fator de Transcrição
HSIL: *High Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau)
HPV: *Human Papillomavirus* (Papilomavírus Humano)
HR-HPV: *High Risk Human Papillomavirus* (Papilomavírus Humano de Alto Risco)
IARC: *International Agency for Cancer Research* (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer)
IHQ: Imunoistoquímica
INCA: Instituto Nacional do Câncer
JEC: Junção Escamo-colunar
L: *Late* (Tardia)
LCR: *Long Control Region* (Região Reguladora)
LR-HPV: *Low Risk Human Papillomavirus* (Papilomavírus Humano de Baixo Risco)
LSIL: *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau)
NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical
NIC1: Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau 1
NIC2: Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau 2
NIC3: Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau 3
OMS: Organização Mundial da Saúde
ORF: *Open Reading Frame* (Região de Leitura Aberta)
pb: pares de bases
PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular)
PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
pRb: Proteína do Retinoblastoma
SIL: *Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão Intraepitelial Escamosa)

1) INTRODUÇÃO

O câncer cervical ou do colo do útero é o quarto tumor mais comum entre mulheres no mundo e o terceiro no Brasil, atingindo predominantemente populações de baixa renda (Ferlay *et al.*, 2018; INCA 2018). Está bem estabelecido que o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical é a infecção persistente pelo Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco oncogênico (Zur Hausen, 1974; Zur Hausen, 2002). A infecção viral pode induzir lesões pré-cancerosas, denominadas Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC) que, eventualmente, podem evoluir para o câncer invasivo. Já foi descrito que a infecção persistente por tipos virais de alto risco seria a causa de mais de 99% das lesões neoplásicas e do carcinoma da cérvix uterina (Ovestad *et al.*, 2016; Xing, Wang & Wu, 2017).

A alta incidência da infecção por HPV assim como as taxas de mortalidade por câncer cervical vêm sendo reduzidas em países que implementaram o rastreamento e o tratamento das lesões pré-cancerosas nos seus serviços de saúde (Murillo *et al.*, 2016). A detecção precoce e a identificação das lesões cervicais são os objetivos centrais do rastreamento do câncer cervical e está fundamentada em três exames: citologia (exame de Papanicolaou), colposcopia e histologia (biópsia). A histologia é usualmente considerada o “padrão-ouro” para identificação das lesões. No entanto, dificuldade tem sido relatada pelos patologistas no diagnóstico diferencial das NICs com o uso dessa metodologia (Martin & O’Leary, 2011), principalmente na transição de NIC grau 2 (NIC2) para NIC3 (Galgano *et al.*, 2010). Este cenário destaca a necessidade de buscar biomarcadores específicos que minimizem a discordância entre os analistas, auxiliando na classificação das lesões e na identificação precoce da doença cervical (Martin & O’Leary, 2011). Estudos detalhados das vias de interação das oncoproteínas do HPV, mecanismos de ação e alvos celulares poderão revelar biomarcadores úteis no manejo das lesões neoplásicas do colo uterino (Termini & Villa, 2008).

Uma série de proteínas tem sido relacionada a mecanismos envolvidos na carcinogênese cervical e vem sendo propostas como possíveis biomarcadores da doença, dentre estas proteínas está L1/HPV, p16, Ki-67, p53, pRb, PCNA p21, p27, TOPO2A e MCM2.

A p16 é uma proteína inibidora das quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e o aumento da sua expressão correlaciona-se com a presença de infecção por HPVs de alto

risco em neoplasias de alto grau e câncer (Nam, *et al.*, 2007; Amaro-Filho *et al.*, 2013; van Baars *et al.*, 2015; Cheah *et al.*, 2016). A proteína p53 desempenha função importante no ciclo celular especialmente no controle pró-apoptótico. Em presença da infecção viral, p53 é inativada pela oncoproteína E6 dos HPVs de alto risco. A expressão de p53 tem sido correlacionada com o grau da lesão cervical (Zhou *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2017). A proteína do retinoblastoma (pRb) também atua como supressora tumoral e está frequentemente inativada em muitos cânceres humanos como o retinoblastoma, osteosarcoma e carcinoma pulmonar de pequenas células (Giacinti & Giordano, 2006; Ganguly & Parihar, 2009; Tomaic, 2016). O antígeno de proliferação ki-67 é expresso durante as fases G2 e M do ciclo celular e tem demonstrado ser confiável para medir a gravidade das lesões NIC (Kanthiya *et al.*, 2016; Mitildzans *et al.*, 2016). Além disso, sua associação com p16 pode melhorar a acurácia diagnóstica das lesões cervicais (Zhong *et al.*, 2015; van Zummeren *et al.*, 2018) e indicar desregulação do ciclo celular (Sun *et al.*, 2018). Além de ki-67, outro marcador que tem sido avaliado por sua capacidade de medir a fração de células em proliferação é a Proteína Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) (Calil *et al.*, 2014). A expressão de PCNA também está associada à replicação e o reparo do DNA (Arisawa, 1999) podendo variar com a gravidade e progressão da neoplasia cervical (Kim *et al.*, 2015).

Até o momento, a proteína supressora tumoral p16 e o antígeno de proliferação celular Ki-67 são os marcadores mais extensivamente investigados pela maioria das pesquisas. Tem sido demonstrado que o uso destas e de outras proteínas poderia melhorar o desempenho dos testes de detecção das lesões pré-cancerosas e auxiliar na identificação das mudanças que acontecem durante a progressão da lesão cervical, aprimorando os métodos de rastreio atuais (Valenti *et al.*, 2017).

Estudos vêm mostrando associação de proteínas de ciclo celular e de proliferação com a gravidade das NIC (Nam *et al.*, 2007; Goel & Mehrotra, 2013; Freitas, Coimbra & Leitão, 2014; Silva *et al.*, 2017), mas ainda é necessário definir melhor a utilização dessas moléculas na prática clínica, isoladas e/ou associadas (Galgano *et al.*, 2010; Bergeron & Doeberitz, 2016; Valenti *et al.*, 2017).

2) OBJETIVOS

2.1) Geral

Analisar os padrões de expressão de pRb, ki-67, E6/HPV e E7/HPV como possíveis biomarcadores do prognóstico e diagnóstico das Lesões Intraepiteliais Cervicais e Carcinoma Epidermoide Invasor, bem como associá-las com a infecção por HPV de alto risco.

2.2) Específicos

- Definir o padrão de expressão imunoistoquímica das proteínas pRb, ki-67, E6/HPV e E7/HPV nas Lesões Intraepiteliais Cervicais e no Carcinoma Epidermoide Invasor e avaliá-las, isoladamente ou associadas;
- Avaliar a infecção pelo HPV por meio da expressão imunoistoquímica das oncoproteína virais E6 e E7 e da detecção do DNA do vírus em amostras histológicas;
- Analisar os padrões de expressão imunoistoquímica de pRb e ki-67 associados à expressão das oncoproteínas E6 e E7 do HPV e a infecção por HPV de alto risco.
- Comparar os padrões de expressão imunoistoquímica das proteínas avaliadas neste trabalho aos das proteínas p16, p53, PCNA e L1/HPV e também com a infecção por HPV de alto risco.
- Avaliar o desempenho diagnóstico dos testes imunoistoquímicos e moleculares realizados.

3) REVISÃO DA LITERATURA

O câncer constitui um grave problema de saúde pública no mundo, especialmente em países menos desenvolvidos. O aumento no número de casos de neoplasias está evoluindo de acordo com o crescimento e envelhecimento da população. Além disso, a presença de fatores de risco como tabagismo, sedentarismo, multiparidade e fatores nutricionais contribuem para o aumento dos casos desta doença (Torre *et al.*, 2015).

Os casos de câncer cervical (CC) ou do colo do útero, sem considerar os tumores de pele não melanoma, correspondem a 8,1% de todos os cânceres em mulheres no Brasil (INCA, 2018). O principal fator que conduz à carcinogênese cervical é a infecção persistente pelo Papilomavirus Humano (HPV). A existência de uma relação entre HPV e o câncer foi proposta inicialmente há mais de 40 anos por Harald Zur Hausen (Zur Hausen, 1974; Zur Hausen, 2002).

As diferenças genéticas entre os HPVs lhes conferem características que influenciam no desenvolvimento das lesões pré-cancerosas do colo do útero, sendo que a persistência da infecção com tipo viral de alto risco é necessária para a progressão das lesões (Zur Hausen, 2002; INCA, 2016; Schiffman *et al.*, 2016). Além da infecção viral, fatores epigenéticos tais como alterações nos genes de supressores tumorais estão sendo investigados como possíveis fatores que contribuiriam para o desenvolvimento da doença (Kori & Arga, 2018).

A maioria das infecções por HPV regredem espontaneamente em decorrência da resposta imune do hospedeiro. Em cerca de 12% dos casos, infecções com tipos específicos de HPVs de alto risco se tornam persistentes levando a graus mais severos de displasia e ao câncer invasivo (Boon *et al.*, 2015; Gupta; Kumar & Das, 2018).

Apesar dos resultados promissores obtidos nas últimas décadas com o rastreamento das mulheres assintomáticas por exames preventivos de câncer do colo do útero (ou Papanicolaou) e, mais recentemente, com o advento de vacinas contra o HPV, o câncer cervical continua sendo uma neoplasia comum. A última estimativa para o Brasil, biênio 2017-2018, aponta a ocorrência de cerca de 16.370 novos casos (INCA, 2018).

3.1) Classificação e Genoma do HPV

Os Papilomavirus (PVs) compreendem um grupo de patógenos conhecidos por infectar tecidos epiteliais de anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos, incluindo seres humanos (Doorbar *et al.*, 2015). Os PVs pertencem à família Papillomaviridae, que conta com mais de 300 genótipos identificados e completamente sequenciados, incluindo cerca de 200 Papilomavírus Humanos (HPVs) (Egawa *et al.*, 2015).

Os HPVs são divididos em cinco gêneros de acordo com as diferenças nas suas sequências de DNA: alpha (α), beta (β), gamma (γ), mu (μ) e nu (ν) (Bernard *et al.*, 2010; de Villiers, 2013; Doorbar *et al.*, 2015). Apesar da abrangência da família Papillomaviridae, apenas uma pequena fração de membros do gênero α estão associadas com o desenvolvimento do câncer (Egawa *et al.*, 2015; Harden & Munger, 2017).

Em sua última atualização, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) classificou os tipos de HPVs em três categorias, com base em dados epidemiológicos e biológicos (Tabela 1). Nesta classificação, 12 tipos foram identificados como de alto-risco, 8 como prováveis ou possíveis alto-risco e 11 como baixo-risco oncogênico (Muñoz *et al.*, 2003; de Villiers *et al.*, 2004; Bouvard *et al.*, 2009; Arbyn *et al.*, 2014).

Tabela 1: Principais genótipos do HPV classificados de acordo com sua oncogenicidade e doença associada.

Risco oncogênico	Tipos de HPV	Doença associada
Alto-risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59	Neoplasia Intraepitelial e Carcinoma Invasivo
Prováveis/possíveis alto-risco*	26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 e 82	Geralmente lesões malignas, mas já foram encontrados em lesões benignas
Baixo-risco	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81 e 89	Lesões mucosas benignas, principalmente condiloma acuminado (verrugas genitais)

* Possuem relação filogenética com os tipos de alto risco, porém as evidências são insuficientes para estabelecer carcinogenicidade (Arbyn *et al.*, 2014). Dados adaptados de IARC (2012); Erickson, Alvarez & Huh (2012) e Harden & Munger (2017).

Os HPVs de alto risco oncogênico (HR-HPVs) são assim classificados devido à sua afinidade para infectar a mucosa do trato genital. Eles são capazes de acionar vias complexas que conduzem ao câncer invasivo, em parte, devido à influência das oncoproteínas virais que interagem com proteínas reguladoras do ciclo celular e de proliferação (Klaes *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). Dentre os HPVs de alto risco, o tipo

16 é o de maior incidência na população e está presente em aproximadamente 60% dos casos de câncer cervical invasivo em todo o mundo (Schiffman *et al.*, 2016).

Por outro lado, a infecção por HPVs de baixo risco oncogênico (LR-HPVs) não induz à desregulação da expressão gênica viral que ocorre durante a infecção por HR-HPV e, portanto, são raramente encontrados no CC, estando mais associados ao aparecimento de verrugas e lesões benignas (Forman *et al.*, 2012).

O estudo de Miranda (2010) realizado com mulheres residentes no município de Ouro Preto revelou uma prevalência de 23,4% de infecção por HPV, sendo 60% HR-HPV, principalmente HPV 16 (34,5%).

Estruturalmente, o HPV se apresenta como um vírus não envelopado, dupla fita de DNA circular, com cerca de 8.000 pb (Figura 1). O genoma do HPV pode ser dividido em três regiões principais: (i) uma região de controle (LCR) não-codificante contendo sequências reguladoras que controlam a transcrição e a replicação viral; (ii) uma região que codifica seis genes precoces E (*early* - E1, E2, E4, E5, E6 e E7) que desempenham diversas funções na infecção das células epiteliais, promovem a replicação viral e a transformação celular; (iii) uma região codificando as proteínas estruturais L1 e L2 que são expressas tardiamente e formam o capsídeo viral (Bravo & Felez-Sanchez, 2015; Graham, 2017).

Após a infecção viral, a expressão gênica é controlada por múltiplos promotores e os produtos dos genes virais são expressos em estágios distintos do ciclo de vida do HPV (Schiffman *et al.*, 2016).

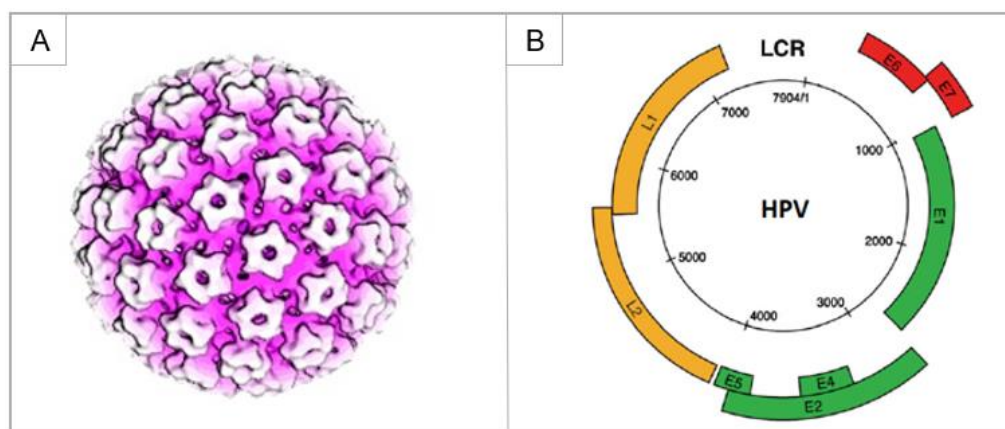


Figura 1. (A) Modelo Tridimensional do HPV - Fonte: Rosemblatt *et al*, 2005. (B) Genoma do α -HPV - Fonte: Doorbar, 2015 (adaptada)

3.2) Ciclo de vida do HPV e desenvolvimento do câncer cervical

Os HPVs são vírus epiteliotrópicos que infectam as células basais do epitélio escamoso. A infecção ocorre preferencialmente na Zona de Transformação (ZT), que é a região próxima ao ponto de encontro das células colunares endocervicais e o epitélio escamoso estratificado da ectocérvice. A maioria das lesões surge na ZT, pois o epitélio dessa região está sujeito a mudanças contínuas e acredita-se que tais características estejam associadas ao desenvolvimento do câncer cervical (Ghittoni *et al.*, 2009).

A infecção por HPV pode evoluir de acordo com duas fases: a fase inicial é denominada “infecção produtiva” e antecede a “fase de transformação”, que geralmente surge após um período longo de infecção. A transmissão do vírus ocorre quase que exclusivamente por contato sexual, o qual pode ocasionar microlesões na membrana epitelial expondo as células das camadas basais às partículas virais. Nas células infectadas, o genoma viral é amplificado utilizando a maquinaria do hospedeiro dando início à fase produtiva da infecção pelo (Steenbergen *et al.*, 2014). As proteínas E1 e E2 do genoma do HPV estão entre as primeiras a serem expressas e são consideradas essenciais nessa fase, elas mantêm reduzido número de cópias do episoma viral nas células basais e impedem a integração do genoma do vírus (Tornesello *et al.*, 2017; Moody, 2017).

Os estágios posteriores do ciclo de vida viral acompanham a diferenciação epitelial e caracterizam-se pela expressão altamente controlada das proteínas do HPV e amplificação do DNA para milhares de cópias por célula (Moody, 2017). As oncoproteínas E6 e E7 têm o papel de modificar o ambiente celular para auxiliar na amplificação do genoma do vírus, através da entrada na fase S nas camadas epiteliais superiores. E4 e E5 também contribuem para a replicação viral. Acredita-se que ocorra a fusão entre E4 e E1 ao final do ciclo celular auxiliando na liberação dos vírus. E5 tem a capacidade de estabilizar o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e a atividade quinase da proteína ativada por mitógeno (MAP) (Doorbar, 2007; Doorbar *et al.*, 2012; Egawa *et al.*, 2015). No último estágio do ciclo de vida produtivo do HPV, o genoma amplificado é empacotado em partículas virais produzidas a partir das proteínas L1 e L2 e os vírus são liberados na superfície epitelial (Egawa *et al.*, 2015; Doorbar *et al.*, 2012). A tabela 2 resume as principais funções das proteínas virais.

Infecções produtivas no colo do útero podem causar anormalidades celulares leves a moderadas e, histologicamente, tais condições se manifestam como Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC) de graus 1 ou 2 (Figura 2) (Steenbergen *et al.*, 2014).

Tabela 2: Funções das proteínas do Papillomavirus Humano

Proteínas virais	Função
Precoces (E = <i>early</i>)	
E1	Função de helicase; essencial para a replicação viral e controle da transcrição gênica
E2	Essencial para a replicação viral e controle da transcrição gênica; segregação genômica e encapsulação
E1-E4	Ligação à proteína do citoesqueleto
E5	Interação com receptores EGF/PDGF
E6	Interação com várias proteínas celulares; E6 de HR-HPV causa degradação de p53 e ativa telomerasas
E7	Interação com várias proteínas celulares, tais como pRb e transativação de promotores E2F-dependentes
Tardias (L = <i>late</i>)	
L1	Principal proteína do capsídeo viral; responsável pela montagem dos capsídeos pentaméricos para formar os vírions icosaédricos
L2	Envolvida na encapsulação do DNA viral, facilita a entrada do vírus na célula

Fonte: Gupta, Kumar & Das, 2018 (adaptada).

Apesar da alta prevalência da infecção pelo HPV, as alterações provocadas pelo vírus raramente levam ao carcinoma invasivo e, para mulheres jovens, a regressão da infecção pode ocorrer dentro de 2 a 5 anos (Erickson, Alvarez & Huh, 2012; Doorbar *et al.*, 2015). A infecção também pode permanecer em um estado latente onde os níveis virais estão diminuídos devido à supressão pela imunidade mediada por células. Com o avanço da idade e redução do controle imunológico uma infecção latente pode ser reativada (Schiffman *et al.*, 2016) possibilitando o surgimento de novas lesões.

Por razões ainda não totalmente esclarecidas, as oncoproteínas E6 e E7 dos tipos de HPV de alto risco estão envolvidos com a capacidade de persistência do vírus, desempenhando funções essenciais para induzir transformação celular e manter o fenótipo maligno (Doorbar, 2012). Tem-se sugerido que a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro seja um evento crucial na progressão do tumor cervical (Tornesello *et al.*, 2013; Freitas, Coimbra & Leitão, 2014; Valenti *et al.*, 2017).

A clivagem do DNA viral geralmente ocasiona a deleção do gene E2 que controla a expressão de E6 e E7 (Freitas, Coimbra & Leitão, 2014; Moody, 2017). Neste ambiente, as oncoproteínas passam a ser superexpressas interferindo, direta e/ou indiretamente, nas funções das proteínas celulares e alterando vias importantes de apoptose, proliferação e motilidade celular (Figura 3A) (Oyervides-Muñoz *et al.*, 2018). A chamada “fase de transformação” surge em consequência de todos esses eventos coordenados que vão permitir que o vírus escape dos processos de defesa imune e de reparo de danos celulares do organismo (Figura 3B) (Gupta, Kumar & Bhudev, 2018). Considerando as características morfológicas, as lesões NIC 3 e algumas classificadas como NIC 2 geralmente aparecem durante esta fase (Figura 2). A distinção entre NIC 2 resultantes de infecção produtiva ou de transformação não é possível quando se utiliza apenas critérios histológicos (Steenbergen *et al.*, 2014).

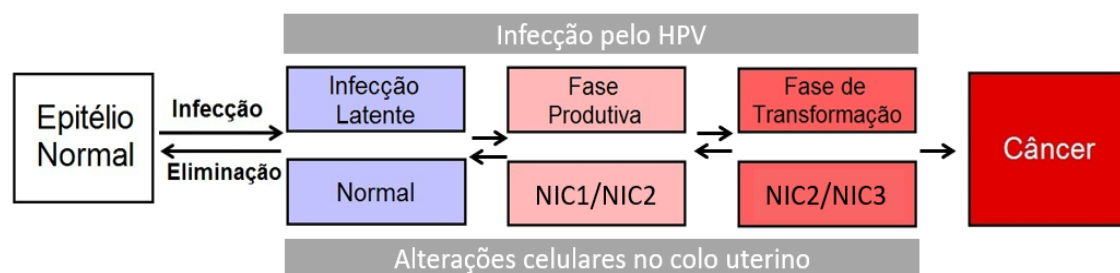


Figura 2. Carcinogênese cervical: história natural da infecção viral e alterações celulares que ocorrem paralelamente à infecção pelo HPV. NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical. Fonte: Steenbergen *et al.*, 2014 (modificado).

Os efeitos de E7 parecem ser cruciais no início do desenvolvimento tumoral enquanto E6 contribui mais durante os estágios agressivos da doença cervical (Pim, *et al.*, 2012). A função-chave de E7 está na sua capacidade de associar-se com a proteína pRb que desempenha papel crítico na regulação do ciclo celular. O nível de fosforilação de pRb permite o controle eficaz da transição da fase G1 para S. No seu estado fosforilado pRb não é capaz de ligar-se a E2F, um fator de transcrição necessário para a progressão do ciclo (Doorbar, 2006). Em células infectadas por HR-HPV, a formação de um complexo entre pRb e a oncoproteína viral E7 substitui a regulação normal de pRb sobre o fator de transcrição E2F e assim, E7 induz a expressão constitutiva de genes responsivos a E2F (Figura 3), tais como a quinase dependente de ciclina 2 (CDK2) e ciclinas A e E (Moody & Laimins, 2010; Tomaic, 2016).

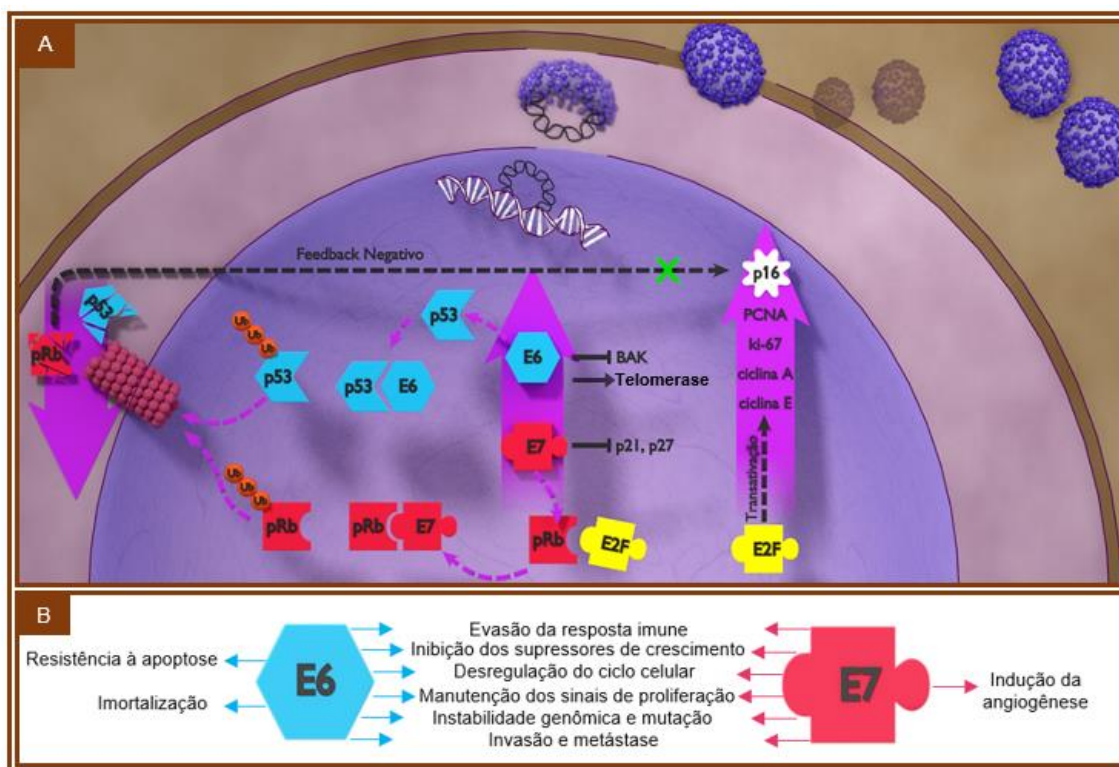


Figura 3. (A) Principais mecanismos de ação das oncoproteínas E6 e E7 dos HR-HPVs sobre algumas proteínas do hospedeiro durante a integração do DNA viral. **(B)** Efeitos carcinogênicos resultantes das ações das oncoproteínas E6 e E7 nos seus alvos celulares. Bishop *et al.*, 2012 (modificada); Gupta, Kumar e Bhudev *et al.*, 2018 (modificada).

Um estado permissivo para não-reparo de mutações e instabilidade cromossômica surge como consequência das interações entre pRb e E7 (Portari *et al.*, 2013). O aumento da expressão de p16 em lesões neoplásicas mais graves, é exemplo clássico de tal interação. Em resposta aos níveis diminuídos de pRb nas células devido à sua degradação, o controle exercido por pRb sobre p16 é perdido e a proteína passa a ser superexpressa (Figura 3A) (Baak *et al.*, 2006; Doorbar, 2006).

Além disso, E7 bloqueia o efeito inibidor de p21 e p27 sobre as quinases dependentes de ciclina (CDK) cujo alvo principal é a ciclina CDK2 que estimula a transição de G1 para a fase S. A ação de E7 sobre essas proteínas, somada às suas ações em pRb, intensifica os estímulos celulares de progressão do ciclo celular, retarda a diferenciação celular e contribui para o estado hiperproliferativo do epitélio escamoso (Freitas, Coimbra & Leitão, 2014; Moody, 2017).

Todas as alterações provocadas por E7 são reforçadas pela atividade da oncoproteína E6 que parece desempenhar funções essenciais durante os estágios agressivos da doença (Pim *et al.*, 2018). O principal alvo celular de E6 é o supressor tumoral, p53, fator chave no controle pró-apoptótico (Thomas & Banks, 1998; zur

Hausen 2002, Doorbar, 2006; Ramirez *et al.*, 2015). A função mais descrita de p53 é o seu papel na resposta ao dano do DNA. Na presença de defeitos no material genético p53 ativa proteínas de reparo e quando o dano não pode ser corrigido ela induz a parada do ciclo celular ativando a ciclina inibidora de quinase, p21, que conduz a célula à morte por apoptose (Rashid, Rothan & Yusoff, 2015).

Nas células infectadas por HPVs de alto risco, E6 induz a degradação da proteína p53 via ubiquitina-proteassoma (Figura 3A) reduzindo a eficácia da resposta de dano ao DNA (Ghittoni *et al.*, 2009). A ausência de reparo do DNA mutado favorece o acúmulo de mutações secundárias que persistirão devido ao bloqueio dos mecanismos pró-apoptóticos. Essa sequência de falhas resultará em aumento da proliferação, imortalização celular e, conseqüentemente, em maior risco de formação de tumores (Doorbar, 2006).

Além dos seus efeitos em p53, a oncoproteína E6 dos HR-HPVs apresenta domínios de interação em BAK (outra proteína envolvida no controle pró-apoptótico inibida por E6) e na enzima telomerase (Boulet, 2007). Através da ativação da transcrição da telomerase, E6 impede o encurtamento dos telômeros e conseqüentemente a senescência celular que, juntamente com a inativação de pRb por E7, é um passo essencial na imortalização (Moody, 2010).

A interação dos produtos dos oncogenes virais com proteínas chave do ciclo celular reflete em aumento da proliferação das células e crescimento tumoral. Essas mudanças podem ser percebidas diretamente pela elevação da expressão de proteínas envolvidas na proliferação celular, tais como PCNA e ki-67 (Figura 3A) (Arisawa *et al.*, 1999).

Embora alguns estudos tenham relatado aumento da expressão dos oncogenes virais E6 e E7 em lesões de alto grau e no câncer cervical (Ramirez *et al.*, 2015; Baron *et al.*, 2015; Stiasny *et al.*, 2016; Valença *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2017; Hong *et al.*, 2017), a carcinogênese pode ocorrer independentemente desses genes (Oyervides-Muñoz *et al.*, 2018).

Modificações epigenéticas (tais como metilação do DNA) na região LCR dos HPVs poderia restringir a transcrição de E6 e E7, para evitar a instabilidade genômica deletéria causada pelo aumento da expressão gênica dessas oncoproteínas (Groves & Coleman, 2015).

3.3) Diagnóstico do Câncer Cervical

Como descrito, há duas fases importantes no desenvolvimento da neoplasia cervical: (i) infecção pelo HPV e (ii) desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas.

O HPV é detectado em 11-12% do material cervical das mulheres sexualmente ativas, na ausência de doença aparente, mas pode atingir entre 50-70% das mulheres com neoplasia de baixo grau e até 100% daquelas apresentando lesão grave (Doorbar *et al.*, 2015).

Vários estudos sobre os métodos de triagem e as técnicas diagnósticas para detecção do DNA do HPV e rastreio das lesões precursoras do câncer vêm sendo desenvolvidos (Tringler *et al.*, 2004; Gatta *et al.*, 2011; Goel & Mehrotra, 2013; Calil *et al.*, 2014; van Baars, *et al.*, 2015; Shain *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017; Kori & Arga, 2018). Os métodos moleculares são os mais comumente usados para o diagnóstico da infecção pelo vírus. Dentre as técnicas utilizadas para detecção do DNA viral podemos citar a hibridação *in situ*, *Southern Blotting*, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e captura híbrida (Abreu *et al.*, 2012; Choi & Park, 2016; Poljak *et al.*, 2016). Apesar da alta sensibilidade dos testes de HPV, eles ainda não estão determinados como triagem primária na maioria dos países, embora novas recomendações que privilegiam a implementação desses métodos estão ganhando impulso (Gradíssimo & Burk, 2017; Melnikow *et al.*, 2018). Órgãos internacionais como a Sociedade Americana do Câncer reconhece a eficácia dos testes de HPV, mas ressalta que ainda há necessidade de mais estudos para o encaminhamento dos resultados positivos. Além disso, o custo-benefício e a adesão a uma nova estratégia de rastreio são áreas que precisam ser melhor estudadas antes de uma mudança em larga escala dos programas de triagem já preconizados (Erickson *et al.*, 2012).

Apesar da influência da infecção pelo HPV no desenvolvimento das neoplasias, o principal objetivo da atual triagem cervical é a detecção das alterações celulares e a identificação das lesões precursoras do câncer. Assim, a estratégia primária dos programas de rastreamento é a realização do exame de citologia oncológica (Papanicolaou), seguida da colposcopia em pacientes que apresentaram exame citológico alterado e o diagnóstico final, que define o grau da lesão e o manejo clínico das pacientes, é feito pelo exame histopatológico (Sideri *et al.*, 2015).

O exame citológico foi desenvolvido por George Nicholas Papanicolaou que, em 1920, elaborou a técnica de citologia esfoliativa para estudar as células vaginais e do colo uterino. Papanicolaou criou uma nomenclatura que expressava se as células observadas eram normais ou não. Assim, as lesões eram separadas em classes I, II, III, IV e V. A classe I indicava ausência de células atípicas ou anormais; a II, citologia atípica, mas sem evidência de malignidade; a III, citologia sugestiva, mas não conclusiva de malignidade; a IV, citologia fortemente sugestiva de malignidade; e a V, citologia conclusiva de malignidade. No entanto, essa nomenclatura não priorizava os aspectos histológicos, fazendo necessária a elaboração de uma classificação que desse maior atenção a essas características, o que foi alcançado posteriormente com o Sistema de Bethesda (INCA, 2012).

A partir do resultado citológico, pode ser indicada a realização de outro exame, a colposcopia, realizada em um aparelho conhecido como colposcópio, que permite visualizar o colo uterino com aumento de 10 a 40 vezes. Nesse exame, é feita uma inspeção visual aplicando ácido acético para realçar a área a ser visualizada (Silva Filho *et al.*, 2000). O método visa identificar alterações macroscópicas na cor e morfologia da mucosa cervical. A colposcopia é uma técnica relativamente precisa e muito útil na avaliação da doença pré-neoplásica cervical e é usada para direcionar o local da biópsia em mulheres com resultados anormais de exame de Papanicolaou, (Nam, 2007; Rahimi *et al.*, 2018).

Após os resultados dos testes citológico e colposcópico constatarem a necessidade do exame histológico, a mulher será encaminhada para tal. O exame histológico ou anatomopatológico é baseado no critério arquitetural e celular, sendo considerado o padrão ouro de diagnóstico morfológico. Este exame é realizado com a retirada de tecido de uma superfície suspeita de presença de lesão ou malignidade (Sellors & Sankaranarayanan, 2003). Em 1952, a OMS criou a primeira nomenclatura para as alterações histológicas, em que utilizava os conceitos “Displasia leve, displasia moderada e Displasia acentuada” para a Classe III da citologia de Papanicolaou, “Carcinoma *in situ*” para a Classe IV e “Carcinoma invasor” para Classe V. A presença de coilocitose foi relacionada às alterações celulares associadas à infecção pelo HPV (INCA, 2012). Em seguida, surgiu a classificação histológica de Richart (1967), atualmente utilizada, que propõe o conceito de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) subdividida em três graus, NIC 1, 2 e 3 e está correlacionada à classificação citológica

do esfregaço cervical, o Sistema de Bethesda (Sellors & Sankaranarayanan, 2003). As nomenclaturas citopatológica e histopatológica utilizadas para o diagnóstico das lesões cervicais escamosas, bem como suas equivalências são mostradas na tabela 3.

O diagnóstico da NIC baseia-se na avaliação da expansão das células basais através das camadas do epitélio e da sua atividade mitótica. O grau de hiperplasia epitelial, ou seja, o aumento da espessura das camadas basal e parabasal é a primeira característica usada para classificar a lesão NIC1. Além disso, estão presentes discretas anormalidades nucleares, bem como ocasionais figuras mitóticas no terço basal do epitélio decorrentes da diferenciação anormal e maturação das células (Sellors & Sankaranarayanan, 2003; Castellanos *et al.*, 2015)

Em segundo lugar, são avaliadas as características que indicariam a infecção produtiva do HPV como coilocitose e queratinização alterada (Jenkins, 2007). A coilocitose é a característica histológica indicativa de infecção pelo HPV, geralmente é vista nas células superficiais na forma de um halo claro na região perinuclear acompanhada de hiperchromasia. Apesar de ser uma característica bem definida, a coilocitose abrange o epitélio de forma muito focal com extensão variável, tornando-se um critério insensível para diagnosticar a infecção pelo HPV (Jenkins, 2007).

Em NIC 2, as células em proliferação ocupam mais da metade do epitélio e a atipia nuclear é evidente até os 2/3 do epitélio basal. Figuras mitóticas anormais estão presentes em um nível mais alto do epitélio (Sellors & Sankaranarayanan, 2003). A presença de aneuploidias em lesões NIC 2 ou mais graves é uma característica importante para discriminá-las das lesões NIC 1. A distinção das lesões neste estágio da doença é clinicamente importante, uma vez que NIC 2 é considerado uma lesão de transformação e usualmente representa o limiar para o tratamento (Jenkins, 2007).

A NIC 3 (incluindo o carcinoma *in situ*) é a lesão precursora imediata do carcinoma invasivo. Neste estágio, a maturação celular pode estar ausente ou confinada ao terço superior do epitélio. As anormalidades nucleares estão presentes na maioria ou em toda espessura do epitélio, figuras mitóticas são encontradas em todos os níveis do epitélio e mitoses atípicas são frequentes. Essa etapa é associada ao acúmulo de danos nos cromossomos das células hospedeiras que conduzem à ativação de oncoproteínas celulares e/ou neutralização de supressores tumorais (Sellors & Sankaranarayanan, 2003; Ghittoni *et al.*, 2009; Martin & O'Leary, 2011).

Tabela 3: Sistemas de classificação das lesões cervicais.

Classificação citológica de Papanicolaou (1941)	Classificação histológica da OMS (1952)	Classificação histológica de Richart (1967)	Classificação citológica Sistema de Bethesda (2001)
Classe I	-	-	-
Classe II	-	-	Alterações benignas
-	-	-	Atipias de significado indeterminado
Classe III	Displasia leve	NIC 1	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL)
	Displasia moderada e acentuada	NIC2 e NIC3	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL)
Classe IV	Carcinoma <i>in situ</i>	NIC 3	HSIL
			AIS
Classe V	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical; HSIL: lesões intraepiteliais escamosas de alto grau; LSIL: lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau; AIS: adenocarcinoma *in situ*. Fonte: INCA, 2012 (modificado).

NIC 3 (incluindo o carcinoma *in situ*) é a lesão precursora imediata do carcinoma invasivo. Neste estágio, a maturação celular pode estar ausente ou confinada ao terço superior do epitélio. As anormalidades nucleares estão presentes na maioria ou em toda espessura do epitélio, figuras mitóticas são encontradas em todos os níveis do epitélio e mitoses atípicas são frequentes. Essa etapa é associada ao acúmulo de danos nos cromossomos das células hospedeiras que conduzem à ativação de oncoproteínas celulares e/ou neutralização de supressores tumorais (Sellors & Sankaranarayanan, 2003; Ghittoni *et al.*, 2009; Martin & O’Leary, 2011).

O diagnóstico do carcinoma de células escamosas microinvasivo é baseado na profundidade da invasão do estroma e atribui-se um limite superior, que de acordo com a literatura varia de 3 a 5 milímetros. O carcinoma invasor de células escamosas é composto por células escamosas de grau variado de diferenciação (Sellors & Sankaranarayanan, 2003). A Figura 4 mostra a representação histológica das NIC e do carcinoma.

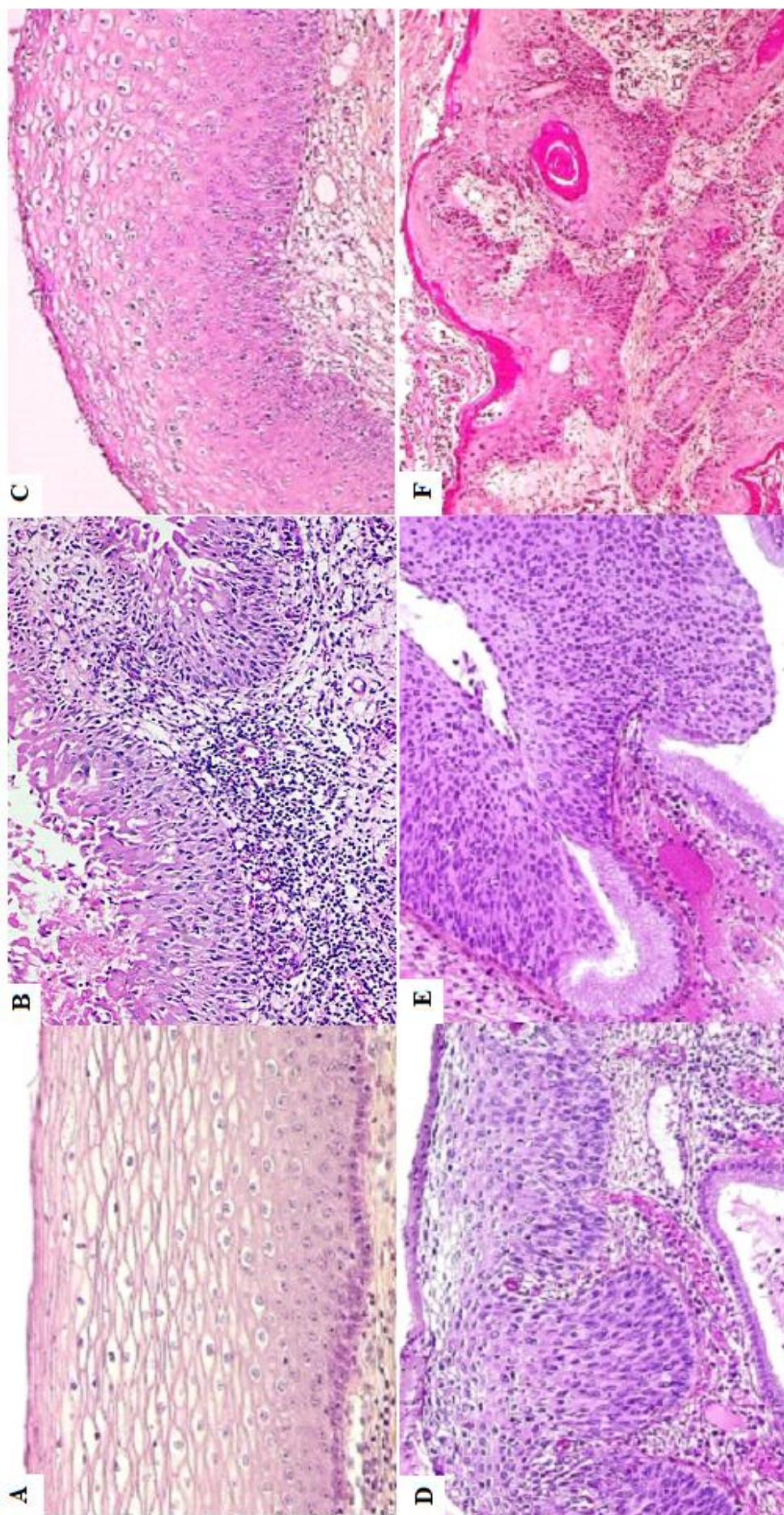


Figura 4. Representação histológica das lesões NIC e carcinoma invasivo. A) Epitélio normal da ectocérvice; B) Cervicite; C) NIC 1 com desorganização do terço inferior do epitélio e discreta coliocitose no terço superior; D) NIC 2 com arquitetura desorganizada na metade inferior do epitélio com critérios citológicos de malignidade e coliocitose; E) NIC 3 ou carcinoma *in situ* com comprometimento glandular; F) CEI bem diferenciado. Fonte: IARC, atlas digital (2004). NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical; CEI: Carcinoma Epidermoide Invasor

A redução nas taxas de incidência e mortalidade por câncer cervical em países que contam com programas de rastreio bem estabelecidos tem demonstrado que o teste de Papanicolaou, aliado à colposcopia e histologia são bastante efetivos na detecção precoce das lesões cervicais. No entanto, apesar do diagnóstico histológico de biópsias cervicais ser frequentemente considerado como “padrão-ouro” para classificação das lesões, ele pode ser significativamente prejudicado pela variabilidade intra e inter-observador (Martin & O’leary, 2011).

A NIC é um processo dinâmico no qual o epitélio apresenta mudanças ao longo do tempo em decorrência de fatores como inflamação, atipia, gravidez e atrofia que complicam o diagnóstico de lesões pré-malignas (van Baars *et al.*, 2015). O diagnóstico de NIC2 tende a ser o mais controverso e o menos reprodutível de todos os diagnósticos cervicais, há evidências de que a grande maioria das lesões NIC2 seja transitória e regrida em períodos relativamente curtos (Castle *et al.*, 2007; Galgano *et al.*, 2010). Em contraste, a NIC3 tem uma probabilidade muito maior de progressão para invasão mesmo que muitas dessas lesões possam eventualmente regredir (IARC, 2012).

A necessidade de se identificar e diferenciar de forma inequívoca as neoplasias de baixo e alto grau tem grande valor clínico, pois pode auxiliar no prognóstico, no diagnóstico precoce e no direcionamento do tratamento das pacientes, principalmente daquelas com NIC2 (Ovestad *et al.*, 2010).

3.4) Biomarcadores

O entendimento de que as NICs são lesões precursoras com potencial de evoluir ao câncer cervical, gerou uma onda de esforços em busca de metodologias que complementem o diagnóstico da doença (Silva *et al.*, 2017; Valenti *et al.*, 2017; Nuovo *et al.*, 2018). Fornecer técnicas viáveis e acessíveis que melhorem a eficiência dos programas e aumente a cobertura de rastreio da população, tornou-se o objetivo central da pesquisa por novos métodos de triagem (Wentzensen & Doeberitz, 2012).

A principal estratégia desenvolvida para complementar o rastreio primário é a pesquisa de moléculas do HPV ou do hospedeiro para utilização como biomarcadores do câncer cervical, identificadas com base na compreensão da carcinogênese viral (Bishop *et al.*, 2012; Wentzensen *et al.*, 2012). A detecção dessas moléculas difere pelo delineamento do método utilizado (simplicidade de execução e custo-benefício), bem

como pelos alvos de detecção (DNA e RNA do HPV, oncoproteínas virais, proteínas celulares e anticorpos séricos) (Bishop *et al.*, 2012).

As pesquisas por marcadores moleculares específicos do câncer cervical demonstram que eles podem fornecer uma combinação de alta sensibilidade e especificidade para detecção das lesões pré-cancerosas (Sahasrabudde, Luhn & Wentzensen, 2011). A maioria das moléculas que estão sendo estudadas está envolvida na perturbação da regulação do ciclo celular e proliferação em resposta às oncoproteínas E6 e E7 de HPVs de alto risco (Freitas, Coimbra & Leitão, 2014). Algumas mostraram ser capazes de detectar lesões com mais chances de evoluir para formas invasivas, como é o caso de p16, E-caderina, pRb e p53 (Valenti *et al.*, 2017).

Entre os biomarcadores estabelecidos para facilitar o rastreio precoce do cancer cervical, a proteína reguladora do ciclo celular, p16, demonstrou ser altamente sensível e específica como indicador da neoplasia escamosa e glandular de alto grau (Sarwath *et al.*, 2017). Segundo alguns autores, a expressão difusa (>25%) de p16 pode ser utilizada como marcador substituto da neoplasia induzida por HR-HPV, estando associado com o desenvolvimento de malignidade (Cheah *et al.*, 2012; Cheah *et al.*, 2016), enquanto p53, principal proteína envolvida na apoptose e supressão tumoral, pode estar mais relacionada à gravidade e progressão da lesão cervical (Ozaki, Zen & Inoue, 2011; Silva *et al.* 2017).

A proteína pRb conhecida por desempenhar um papel crítico como regulador negativo da progressão do ciclo celular e por ser um alvo importante da oncoproteína viral E7, também desperta a necessidade de investigação. Os estudos que avaliam essa proteína associam a sua expressão com a gravidade da lesão NIC (Tringler *et al.*, 2004; Nam *et al.*, 2007; Bahnassy *et al.*, 2007; Son *et al.*, 2012).

O aumento da expressão dos oncogenes virais E6 e E7 em lesões de alto grau e no carcinoma também tem sido relatado (Ramirez *et al.*, 2015; Baron *et al.*, 2015; Stiasny *et al.*, 2016; Valença *et al.*, 2016; Hong *et al.*, 2017). No entanto a avaliação das oncoproteínas virais, ainda sofre de uma escassez de dados científicos. A expressão imunoistoquímica de E6 foi registrada em diferentes tipos de neoplasias associada à infecção persistente por HR-HPV (Roncaglia *et al.*, 2013). A análise da imunorreatividade de E7 em neoplasia cervical pode ser clinicamente relevante para avaliar a fase biológica do vírus e um sinal claro de atividade viral (Faoro *et al.*, 2013).

Dentre os marcadores de proliferação, ki-67 e o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) estão entre os mais investigados. A expressão de ki-67 parece ser um requisito absoluto para a progressão do ciclo celular, além de ser um excelente marcador de proliferação (Scholzen & Gerdes, 2000) e preditor da gravidade da neoplasia (Brown *et al.*, 2012; Amaro-filho *et al.*, 2013; Calil, 2014).

O Antígeno Nuclear de Proliferação Celular é um fator essencial para o metabolismo de ácido nucleico e atua como um componente da maquinaria de replicação e de reparo do DNA, sendo utilizada como marcador substituto de proliferação celular (Kim *et al.*, 2015). Sua expressão foi relacionada com a gravidade e progressão da neoplasia cervical (Wang, *et al.*, 2004; Branca *et al.*, 2007; Assis, 2015; Kim *et al.*, 2015).

Alguns estudos também têm avaliado a utilização da dupla marcação para ki-67 e p16 (Reuschenbach *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2018). Em 2011, foi introduzido um novo sistema que permitiu avaliar essas duas proteínas simultaneamente. Como os dois marcadores são expressos de maneira inversa em células normais, a coloração para ambos poderia ser interpretada como uma desregulação do ciclo celular por ação das oncoproteínas virais. Esta metodologia tem mostrado ter uma *performance* superior aos testes de detecção de HR-HPV, mas ainda são necessários estudos com maior número de amostras e longos períodos de acompanhamento para comprovar esses resultados (Sun *et al.*, 2018).

Até o momento, não há um biomarcador ideal para o rastreamento e acompanhamento das mulheres afetadas, no entanto, a combinação de biomarcadores específicos de displasia em conjunto com procedimentos histológicos podem melhorar significativamente a precisão, acurácia e sensibilidade do programa de triagem cervical contribuindo para o prognóstico e diagnóstico precoce do câncer cervical (Goel & Mehrotra, 2013).

Com base nos mecanismos elucidados acerca dos oncogenes do HPV e suas interações com diferentes proteínas do hospedeiro, tornou-se possível a seleção de biomarcadores que possam ser úteis no diagnóstico e prognóstico das lesões cervicais (Doorbar, 2007) como tem sido demonstrado em muitos estudos (Gatta *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2012; Amaro-Filho *et al.*, 2013; Freitas, Coimbra & Leitão, 2014; Ramirez *et al.*, 2015; Cheah *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017).

4) MÉTODOS

4.1) Amostragem

Nesse estudo foram utilizadas 150 amostras de biópsias cervicais fixadas em formol e incluídas em parafina, obtidas dos arquivos do Laboratório Tafuri (LT), localizado em Belo Horizonte, Minas Gerais (MG), avaliadas no período de 2006 a 2011. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), CAAE: 79261617.6.0000.5150 (Anexo 1).

As amostras foram separadas de acordo com o diagnóstico histopatológico (Sellors & Sankaranarayanan, 2003) em cinco grupos de 30 amostras cada: C (Cervicite); NIC 1 (Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 1); NIC 2 (Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 2); NIC 3 (Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 3) e CEI (Carcinoma Epidermoide Invasor). As amostras foram submetidas a análise IHQ, molecular e estatística (Figura 5).

A faixa etária das mulheres da amostra selecionada foi de 15 a 82 anos. As médias e desvios-padrão de idade nos grupos foram C (41 ± 16); NIC 1 (35 ± 11); NIC 2 (38 ± 14); NIC 3 (36 ± 11) e CEI (48 ± 14).

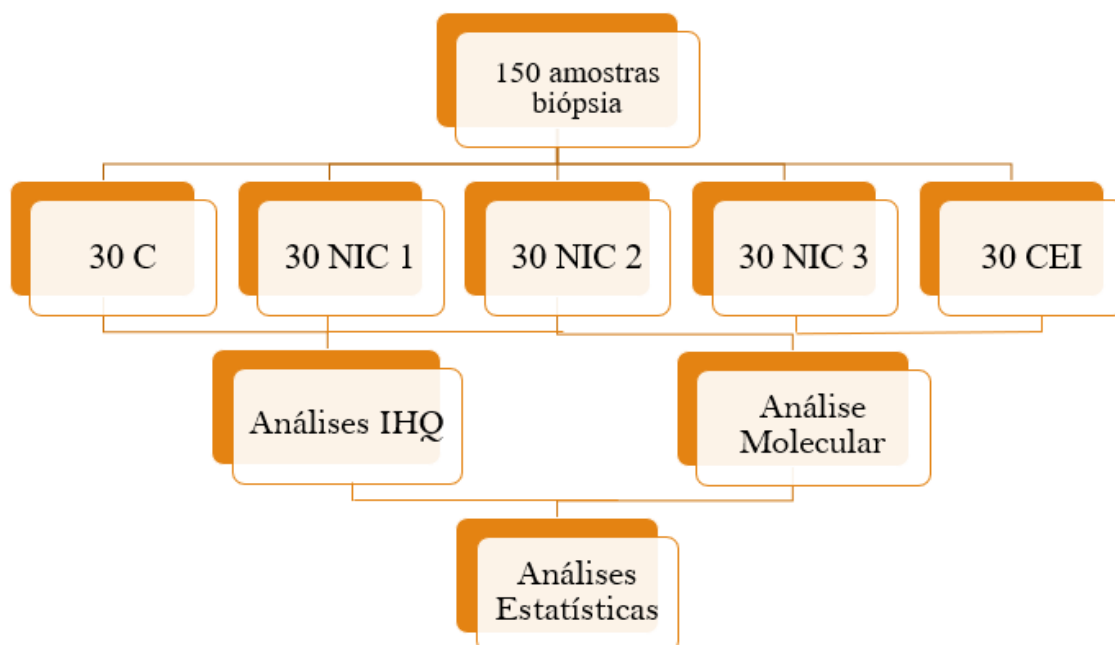


Figura 5: Distribuição das amostras de acordo com o diagnóstico histopatológico e as análises realizadas.

4.2) Padronização da imunoistoquímica: teste de diluição dos anticorpos

Os testes de diluição para os anticorpos primários utilizados foram os primeiros passos no procedimento de imunoistoquímica.

A figura 6 mostra as diluições testadas para os anticorpos anti-pRb, anti-ki-67 e anti-E7/HPV. A diluição escolhida foi aquela que apresentou imunorreatividade citoplasmática reduzida ou ausente sem perda de marcação nuclear, possibilitando a quantificação dos núcleos de forma precisa. Assim, foram definidas para uso neste trabalho, as diluições 1:25 para o anticorpo anti-pRb; 1:10 para o anti-ki-67 e 1:200 para o anti-E7/HPV.

O anticorpo anti-E6/HPV foi testado sem diluição bem como nas diluições 1:300; 1:200; 1:100; 1:50; 1:10 e 1:5. Em todos os casos, o anticorpo permaneceu incubado com o substrato cromógeno por um período de 40 a 60 minutos. No entanto, não foi observada marcação em nenhuma das condições testadas. Desta forma, neste trabalho, não foi possível avaliar a expressão da oncoproteína E6/HPV (as características técnicas deste anticorpo são descritas na tabela 3).

A análise IHQ de p16, p53, PCNA e L1/HPV das mesmas amostras foi realizada por Pitol (2012) e Assis (2015), seguindo o protocolo descrito posteriormente.

Neste trabalho, os resultados das análises IHQ das proteínas pRb, p53, p16, ki-67, PCNA e L1/HPV foram compilados e avaliados comparativamente entre si e aos resultados de detecção da oncoproteína viral E7 e do DNA-HPV.

Para a detecção do HPV pela técnica de IHQ foram utilizados anticorpos com afinidade pelas proteínas virais L1 e E7 de diferentes genótipos do HPV (Tabela 3). O anticorpo contra L1 detecta três tipos de HPV de baixo risco (HPV6, 11 e 42) e oito de alto risco (HPV16, 18, 31, 33, 51, 52, 56 e 58). O anticorpo anti-E7/HPV16 detecta apenas o tipo 16.

A Tabela 4 mostra as características técnicas dos anticorpos e as condições utilizadas na IHQ.

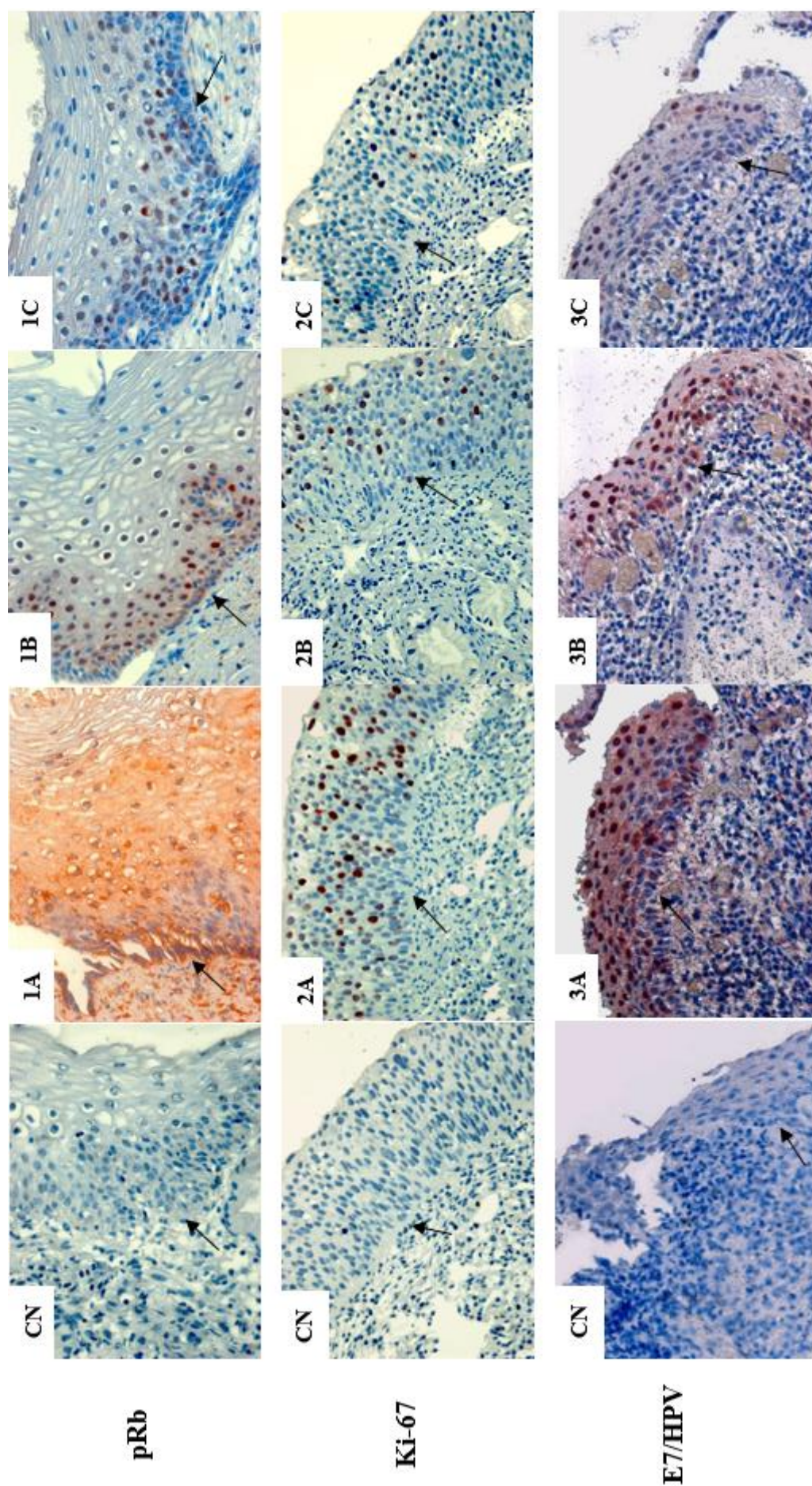


Figura 6. Diluições testadas para os anticorpos utilizados na IHQ. (1) **anti-pRb**: A) 1:10, B) 1:25 e C) 1:50; (2) **anti-Ki67**: A) 1:10, B) 1:25 e C) 1:50 e (3) **anti-E7**: A) 1:100, B) 1:200 e C) 1:250. CN: Controle Negativo. As setas indicam o epitélio escamoso.

Tabela 4: Características técnicas dos anticorpos e condições para execução da IHQ.

Proteína analisada	Anticorpo - Clone	Fabricante/código	Condições da IHQ
			Tempo de incubação com substrato cromógeno (min)
pRb	Monoclonal mouse IF8	Santa Cruz Biotechnology/ sc-102	40
Ki-67	Monoclonal mouse MIB-1	DAKO/M7240	40
E6-HPV16/18	Monoclonal mouse C1P5	Abcam/ab51931	60
E7-HPV16	Monoclonal mouse 289-17013	Abcam/ab30731	10

4.3) Imunoistoquímica (IHQ)

As amostras foram processadas pela técnica de IHQ, utilizando os anticorpos monoclonais anti pRb, anti ki-67 e anti E7-HPV16 e o sistema EnVision Dakocytomation (EnVision® + system-HRP AEC, K4004, DAKO). Foi seguido o protocolo padronizado por Pitol (2012) e adaptado aos anticorpos utilizados neste estudo.

Cortes histológicos com 4µm de espessura foram obtidos no micrótomo rotativo de parafina modelo MRP09® (Lupetec, São Carlos, São Paulo, Brasil) e distendidos em lâminas silanizadas. As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas por imersão em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de álcool, seguidas por água destilada (Anexo 2). Após desparafinização, os cortes foram imersos em tampão citrato 1mM, pH=6,0 e submetidos a aquecimento em forno de micro-ondas por 12 minutos para recuperação dos sítios antigênicos. Posteriormente, os cortes foram colocados em solução 1% de peróxido de hidrogênio em metanol por 30 minutos. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens (5 minutos cada) com solução de TBST (Tris-HCl 0,05M, NaCl 0,15M, pH 7,6; Tween 20 0,05%). Após as lavagens, os cortes foram incubados com anticorpo primário, durante a noite, em câmara úmida a temperatura de 4 a 8° C. A concentração dos anticorpos foi definida por testes de diluição. Os anticorpos foram diluídos em Tris-HCl 0,05M contendo Tween 0,1% (antibody diluent; S3022, DAKO). Como controle negativo foi utilizado um coquetel de imunoglobulinas de camundongos – IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM (Universal Negative Control Reagent; IS750, DAKO).

Após a incubação com o anticorpo primário, foram realizadas 3 lavagens em solução de TBST (5 minutos cada) e as lâminas com os cortes histológicos incubadas com anticorpo secundário ligado à enzima peroxidase (goat anti IgG mouse conjugado com polímero marcado com peroxidase), por 60 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado o substrato cromógeno (3-amino-9-ethylcarbazole e H_2O_2), cujo tempo de revelação foi definido para cada anticorpo (tabela 2). Após decorrido o tempo determinado, os cortes foram lavados 3 vezes (5 minutos cada) em água destilada. Em seguida, as lâminas foram imersas durante 1 minuto em Hematoxilina de Mayer (DAKO), lavadas novamente com água destilada e, finalmente mergulhadas em uma solução de hidróxido de amônio 37mM (LabSynth) por 10 vezes e montadas com meio aquoso (Faramount Mounting Medium, S3025, DAKO). As lamínulas, previamente limpas com detergente extran e álcool 70%, foram fixadas à lâmina com base para unhas.

Neste trabalho foram documentadas para análise, especificamente, células da junção escamo-colunar (JEC) ou zona de transformação cervical, região de metaplasia escamosa ativa, onde o epitélio escamoso estratificado da ectocérvice progressivamente substitui o epitélio glandular da endocérvice.

As fotos foram obtidas no Laboratório Multiusuários do NUPEB, UFOP. As lâminas foram observadas em microscopia convencional em campo claro e a imagem, visualizada em objetiva de 40x, foi capturada por uma microcâmera digital Leica DFC340FX acoplada ao microscópio DM5000B.

A fotodocumentação foi realizada em 10 campos por lâmina para os marcadores pRb e ki-67 e 20 campos por lâmina para E7/HPV definidos por teste de estabilidade.

Para o teste de estabilidade foram contados 50 campos de uma lâmina escolhida ao acaso para cada anticorpo testado. Os campos foram sorteados para compor grupos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 campos e duas análises foram executadas: uma utilizando a contagem de células positivas e outra utilizando o índice de marcação. Para ambas as análises, a estatística apontou que 10 e 20 campos por lâmina seria o número representativo da amostra, para os anticorpos pRb/ki-67 e E7/HPV, respectivamente.

Para a quantificação, somente a coloração nuclear foi considerada como marcação positiva, independente da sua intensidade.

Assim, neste estudo foi realizada a análise quantitativa com base na contagem dos núcleos positivos e negativos nos campos fotografados (Schäffer, 2009; Yonamine *et al.*, 2009; Pitol, 2012), utilizando o software *ImageJ*, disponível gratuitamente na Internet (macbiophotonics.ca). Pela contagem foi determinado o Índice de Proliferação (IP) ou Índice de Marcação (IM) de cada amostra, ou seja, a porcentagem de núcleos positivos em relação ao número total de células quantificadas.

$$\text{IP ou IM} = \frac{\text{número de núcleos positivos por amostra} \times 100}{\text{número total de núcleos por amostra}}$$

4.4) Análises moleculares do DNA do HPV

4.4.1 HPV de alto risco (HR-HPV)

Neste trabalho foi realizada a técnica de PCR em tempo real para detecção qualitativa do DNA de 14 genótipos de HPV de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68). Foi utilizado o kit Bio Gene HPV Alto Risco PCR (Bioclin/Quibasa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

Primeiramente, em microtubos, foram preparados os reagentes de uso. A Solução PCR (TRIS-HCl, Primers e Sondas para os genótipos de HPV alto risco e para endógeno) foi ressuspendida com 110 µL de Água livre de DNase/RNase. O Mix Taq (Polimerase, dNTPs, MgCl₂) foi preparado com 1.050 µL ml de Tampão Mix (TRIS-HCl). O Controle Positivo (Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA) foi ressuspendido com 500µL do Diluente (TRIS-HCl, EDTA). O Controle Negativo foi TRIS-HCl. Foi preparado 1,5 mL de Solução PCR final: 1mL Mix Taq + 100 µL de Solução PCR + 400 µL de Água. À solução PCR final foi adicionado 5µL de DNA das amostras (exceto para os controles), atingindo um volume total de 20 µL por reação. Foi utilizada uma placa de 96 poços onde dois poços foram reservados para os controles negativo e positivo (5µL cada). As placas foram homogeneizadas, colocadas no termociclador QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América). As condições dos ciclos estão descritas na Tabela 5. A técnica foi realizada na sede da Bioclin/Quibasa em Belo Horizonte – MG.

Tabela 5: Condições da PCR tempo real definidas pelo fabricante

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (s)
1	95	120
50	95	10
	60	60

O sistema de amplificação do DNA empregado neste kit requer o uso de uma sonda diferente para cada sequência-alvo. São fornecidas quatro sondas (ROX [referência passiva], VIC, FAM e CY5) que emitem fluorescências distintas. A intensidade de fluorescência emitida pela amostra indica a eficiência da amplificação do DNA e é determinada pelo CT (cycle-threshold). Valor de CT baixo indica alta concentração de material biológico na amostra e que o processo de extração foi eficiente. O CT alto indica baixa concentração de material biológico na amostra e/ou extração ineficiente.

Assim, os resultados foram expressos considerando a fluorescência como determinada (quando as amostras eram positivas para uma ou mais sequências-alvo e nos controles positivo ou endógeno) ou indeterminada (quando as amostras eram negativas para as sequências-alvo e no controle negativo). As informações sobre as sondas empregadas, valor de CT e interpretação dos resultados constam nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6: Características dos detectores/sondas fluorescentes.

Sequência-alvo para	Detector/sonda	Faixa permitida CT	Fluorescência
HPV 16	ROX	21 - 25	determinada
HPV 18	VIC	17 - 21	determinada
HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68	FAM	24 - 29	determinada
Controle	Detector/sonda	Faixa permitida CT	Fluorescência
Positivo	ROX, VIC e FAM	(descritas acima)	determinada
Negativo	-	-	indeterminada
Endógeno	CY5	25 - 31	determinada

Tabela 7: Interpretação dos resultados.

HPV Alto Risco				Resultado
FAM	ROX	VIC	CY5	
CT	CT	CT	CT	Negativo – HPV 16 e 18
Determinado	Indeterminado	Indeterminado	Determinado	Positivo – demais HPVs
CT	CT	CT	CT	Positivo – HPV 16
Indeterminado	Determinado	Indeterminado	Determinado	Negativo – demais HPVs
CT	CT	CT	CT	Positivo - HPV 18
Indeterminado	Indeterminado	Determinado	Determinado	Negativo - demais HPVs
CT	CT	CT	CT	Negativo - HPVs
Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Determinado	

Para análise do HR-HPV neste trabalho, partiu-se do DNA anteriormente extraído por Silva (2015) das 150 amostras. Além da extração do DNA, Silva (2015) também avaliou o DNA do HPV utilizando iniciadores genéricos. Esta análise foi realizada com três cortes histológicos de 10µm de cada bloco de biópsia, obtidos no micrótomo MRP09® (Lupetec, São Carlos, São Paulo, Brasil). A parafina dos cortes foi removida com xilol e etanol absoluto. A extração de DNA foi realizada com o kit QIAamp® DNA FFPE Tissue (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. A concentração e a pureza do DNA extraído foram determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000® (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América).

A detecção do HPV foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional com iniciadores genéricos SPF. A sequência dos iniciadores é apresentada na tabela 8. Os produtos de amplificação das reações foram identificados utilizando eletroforese em gel de agarose 2%. Para aplicação em gel, foram utilizados 5,0µl do produto amplificado e 1,0µl de *Loading Dye Buffer 6X*® (Fermentas, 0,25% de azul de bromofenol, 15% de Ficol tipo 400). A presença do HPV foi confirmada naquelas amostras onde houve amplificação de fragmentos de 65pb.

Tabela 8: Sequência dos iniciadores utilizados na metodologia de PCR convencional.

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos (5'-3')
SPF 1A	GCiCAGGGiCACAATAATGG
SPF 1B	GCiCAGGGiCATAACAATGG
SPF 1C	GCiCAGGGiCATAATAATGG
SPF 1D	GCiCAAGGiCATAATAATGG
SPF 2B	GTiGTATCiACAACAGTAACAAA
SPF 2D	GTiGTATCiACTACAGTAACAAA

4.5) Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software SPSS versão 17.0.

Como os dados não apresentaram distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov foram escolhidos testes não paramétricos para as análises.

Para avaliar a expressão das proteínas virais, de proliferação e do ciclo celular foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os pontos de corte das proteínas avaliadas foram estabelecidos pela Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*).

Para verificar a desempenho diagnóstico das análises imunoistoquímicas das referidas proteínas foram executados os cálculos de sensibilidade, especificidade, acurácia (Anexo 3) e a área sob a curva ROC.

Valores de $p < 0,05$ foram considerados como evidência de associação significativa em todos os testes.

5) RESULTADOS

5.1) Expressão IHQ de pRb, p53 e p16 nas lesões intraepiteliais cervicais e no CEI

Os resultados mostraram associação de pRb ($p=0,000$) com o diagnóstico histopatológico (Tabela 9), sendo o IM desta proteína menor em NIC 3 (4,0%) e CEI (0,5%). Na comparação entre os grupos foi observada diferença significativa na expressão de pRb das amostras de CEI e as de cervicite ($p=0,005$), NIC 1 ($p=0,000$) e NIC 2 ($p=0,000$), bem como de amostras NIC 3 com cervicite ($p=0,009$) e NIC 2 ($p=0,007$).

Tabela 9: Expressão das proteínas de ciclo celular pRb, p53 e p16 de acordo com o diagnóstico histopatológico.

Proteínas	Diagnóstico Histopatológico					<i>p</i> *
	n (IM)	C	NIC 1	NIC 2	NIC 3	CEI
pRb[§]	362 (16,6)	186 (7,3)	307 (12,9)	114 (4,0) ^{a,c}	26 (0,5) ^{a,b,c}	0,000
p53	1137 (62,7)	1185 (59,9)	1246 (69,2)	1307 (54,2) ^c	1308 (50,5) ^{b,c}	0,041
p16	113 (6,5)	727 (47,5) ^a	768 (39,6) ^a	1412 (67,6) ^{a,b,c}	1672 (61,0) ^{a,b,c}	0,000

n= mediana do número de núcleos positivos

IM = mediana do Índice de Marcação (%)

*Teste Kruskal Wallis; Teste Mann-Whitney; Diferença estatística, em relação a C ^a; NIC 1^b; NIC 2^c.

[§] n=146: participantes com ausência de epitélio escamoso foram excluídas desta análise.

C: Cervicite; NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical; CEI: Carcinoma Epidermoide Invasor.

As demais proteínas de ciclo celular, p53 e p16, anteriormente avaliadas por Pitol (2012), foram também apresentadas neste trabalho considerando aquelas amostras onde se analisou pRb (4 amostras com ausência de epitélio escamoso foram excluídas deste estudo). A expressão de p53 ($p=0,041$) e p16 ($p=0,000$) foi associada ao diagnóstico histopatológico. Foi encontrada uma redução discreta no padrão de expressão da proteína p53 nas amostras NIC 3 e CEI comparativamente aquelas com cervicite, NIC 1 e NIC 2 (Tabela 9). Diferença estatística foi observada de NIC 3 para NIC 2 ($p=0,017$) e de CEI para NIC 1 ($p=0,044$) e NIC 2 ($p=0,028$). Maior IM de p53 foi observado em amostras de C (62,7%) e NIC 2 (69,2%) (Tabela 9).

Em relação à proteína p16, foi observado aumento significativo da imunorreatividade de acordo com a gravidade da lesão (Tabela 9). A análise estatística intergrupos indicou maior expressão de p16 em todos os grupos em relação a cervicite, bem como IM mais elevado desta proteína em NIC 3 e CEI comparativamente a NIC 1 ($p=0,001$ e $p=0,000$) e NIC 2 ($p=0,003$ e $p=0,001$). Embora a expressão de p16 tenha diminuído de NIC 1 para NIC 2, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 9).

A Figura 7 mostra o padrão de marcação obtido na imunoistoquímica das proteínas de ciclo celular, evidenciando baixa marcação de pRb e discreta redução de expressão de p53 em NIC 3/CEI; bem como o aumento da marcação de p16 de acordo com a gravidade da lesão. Para p53 e p16 foi observada intensa imunorreatividade citoplasmática.

5.2) Expressão IHQ de Ki-67 e PCNA nas lesões intraepiteliais cervicais e no CEI

Os resultados da expressão IHQ dos marcadores de proliferação, Ki-67 e PCNA, mostraram associação estatisticamente significativa com o diagnóstico histopatológico (Tabela 10: $p=0,020$ e $p=0,000$, respectivamente).

Devido a problemas técnicos com o anticorpo anti-Ki-67 foi necessária a exclusão de algumas amostras para realizar a análise dessa proteína. Assim, o n amostral avaliado foi 117, sendo 25 amostras C, 29 NIC 1, 28 NIC 2, 27 NIC 3 e 8 CEI. Os casos de NIC 3 e CEI foram agrupados e os resultados da análise de Ki-67 mostraram um aumento do IP em NIC 3/CEI. Diferença estatística na expressão desta proteína foi observada entre o grupo de NIC 3/CEI e o de cervicite e de NIC 2 ($p=0,011$ e $p=0,007$, respectivamente) (Tabela 10).

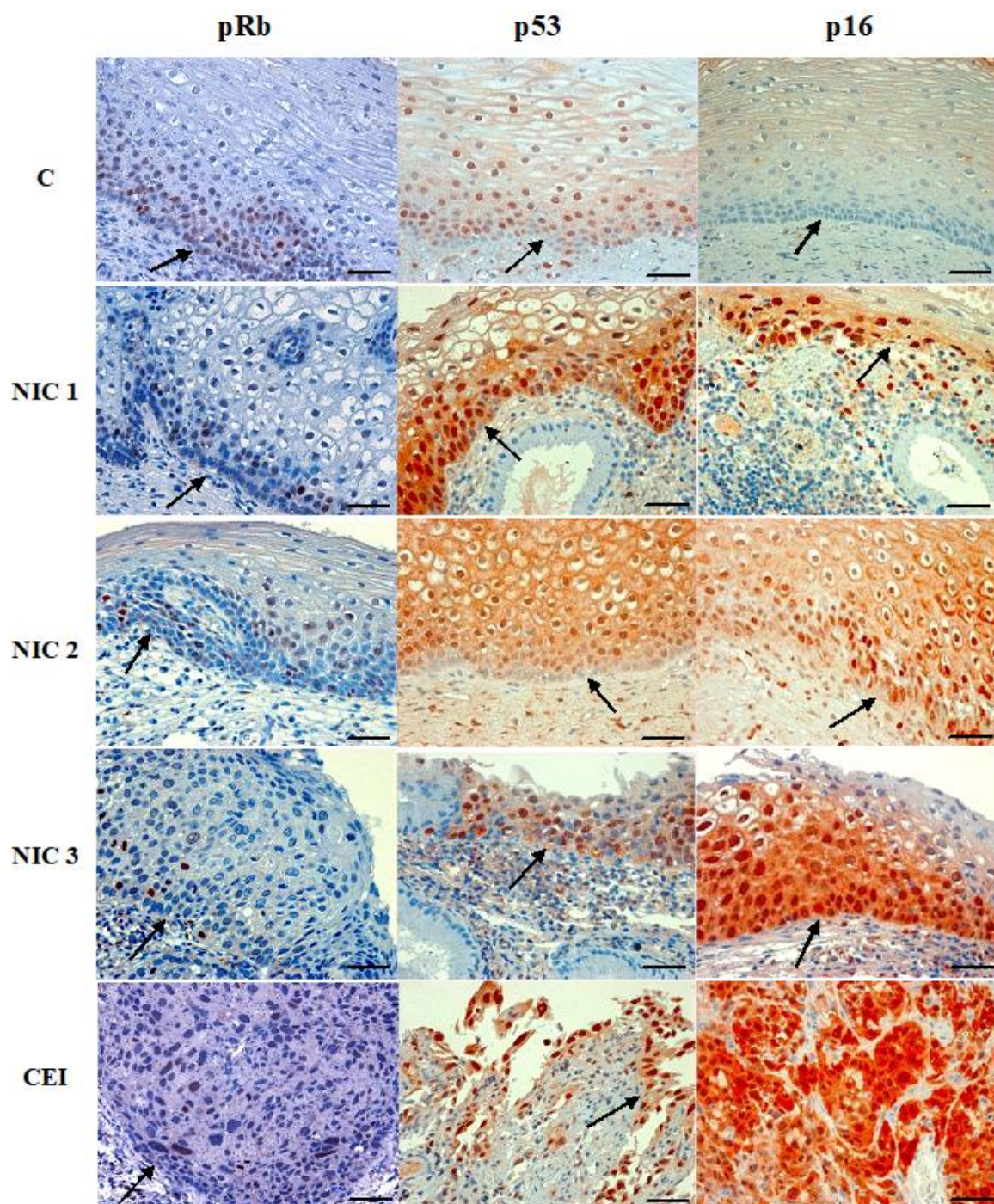


Figura 7. Padrão de marcação observado na imunoistoquímica utilizando os anticorpos anti-pRb, anti-p53 e anti-p16. Cervicite (C); Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 1 (NIC 1); Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 2 (NIC 2); Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 3 (NIC 3); Carcinoma Epidermoide Invasor (CEI). As fotomicrografias de p53 e p16 foram cedidas por Pitol (2012) e colocadas nesta figura para comparação com pRb. Barra = 50µm. As setas indicam o epitélio escamoso.

Tabela 10: Expressão das proteínas de proliferação Ki-67 e PCNA de acordo com o diagnóstico histopatológico.

Proteínas n (IP)	Diagnóstico Histopatológico				<i>p</i> *
	C	NIC 1	NIC 2	NIC 3/CEI	
Ki-67	46 (1,0)	36 (1,9)	20 (0,8)	198 (4,4) ^{a,c}	0,020
PCNA[§]	1053 (44,3)	1193 (59,7)	1912 (73,2) ^{a,b}	2067 (67,1) ^{a,b}	0,000

n= mediana do número de núcleos positivos.

IP = mediana do Índice de Proliferação (%)

*Teste Kruskal Wallis

Teste Mann-Whitney: Diferença estatística, em relação a C^a; NIC 1^b; NIC 2^c

§ n=149: participante com ausência de epitélio escamoso foi excluída desta análise

O IP de PCNA, anteriormente avaliado por Assis (2015) foi maior em NIC 2 (73,2%), com ligeira queda em NIC 3/CEI (67,1%). Houve associação estatística para o grupo cervicite quando comparado a NIC 2 ($p=0,001$), NIC 3/CEI ($p=0,004$) e de NIC 1 para NIC 2 ($p=0,001$) e NIC 3/CEI ($p=0,038$) (Tabela 10).

A Figura 8 mostra o padrão de marcação obtido na IHQ utilizando os anticorpos anti-Ki-67 e anti-PCNA.

5.3) Análise do Papilomavírus Humano: L1/HPV, E7/HPV e HR-HPV

A presença da infecção por HPV foi avaliada pela expressão das proteínas virais L1 e E7 e pela detecção do DNA do vírus.

Na análise imunoistoquímica de E7/HPV, foi observada associação dessa oncoproteína com o diagnóstico histopatológico ($p=0,009$). Os IM mais elevados estiveram presentes nos grupos cervicite (49,0%) e NIC 1 (44,1%), com diferença significativa entre estes grupos comparados a NIC 2 ($p=0,030$ e $p=0,043$, respectivamente) e CEI ($p=0,003$, para ambos) (Tabela 11).

A análise da expressão de L1/HPV, anteriormente avaliada por Pitol (2012), foi apresentada considerando as mesmas amostras em que se avaliou E7/HPV e os resultados são mostrados na Tabela 11.

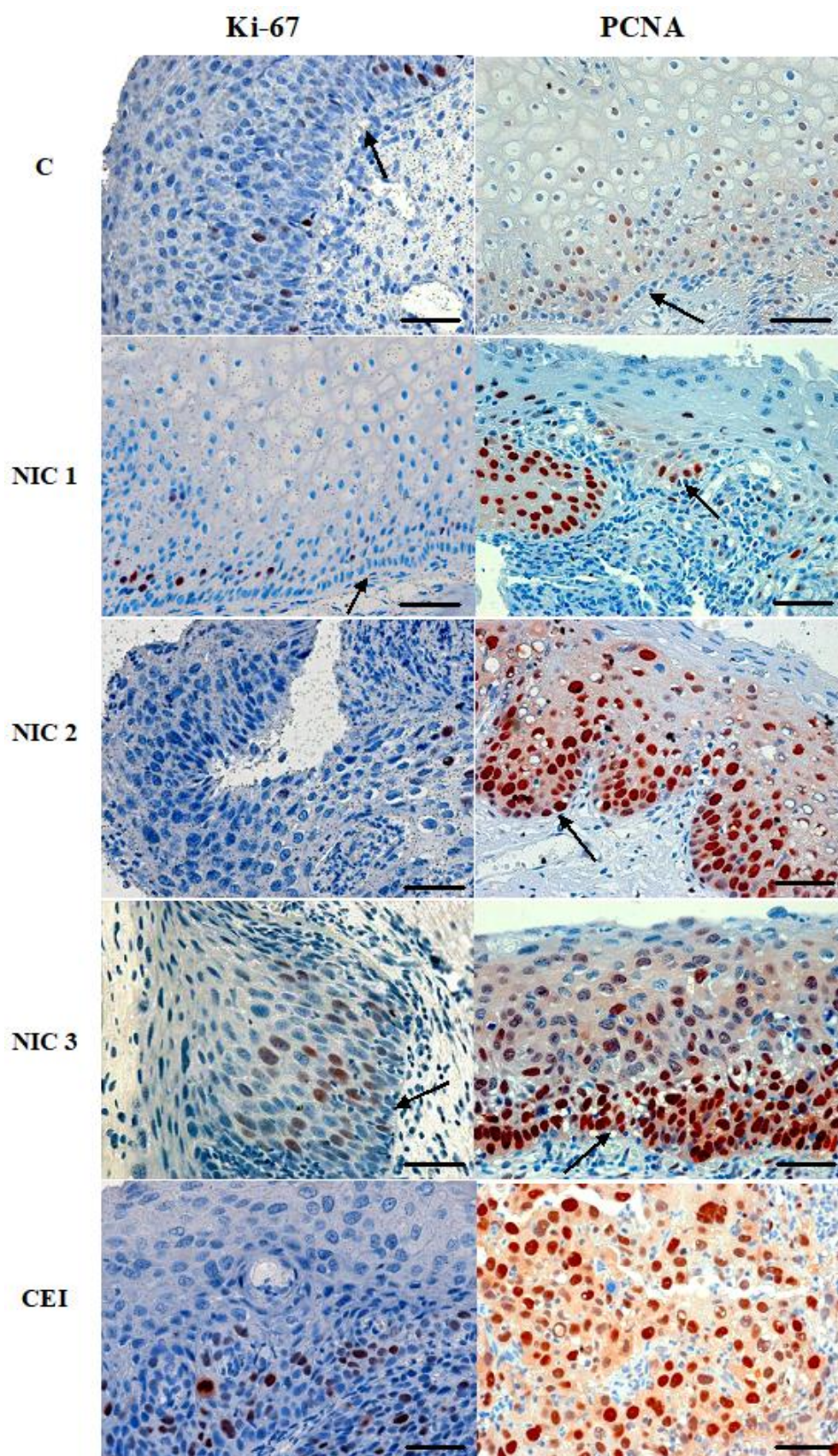


Figura 8. Padrão de marcação observado na imunoistoquímica utilizando os anticorpos anti- Ki67 e anti-PCNA. Cervicite (C); Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 1 (NIC 1); Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 2 (NIC 2); Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 3 (NIC 3); Carcinoma Epidermoide Invasor (CEI). As fotomicrografias de PCNA foram cedidas por Assis (2015) e colocadas nesta figura para comparação com Ki-67. Barra = 50 μ m. As setas indicam o epitélio escamoso.

Tabela 11: Expressão das proteínas do HPV de acordo com o diagnóstico histopatológico.

Proteínas n (IM)	Diagnóstico Histopatológico					p*
	C	NIC 1	NIC 2	NIC 3	CEI	
E7-HPV[§]	1483 (49,0)	1337 (44,1)	920 (28,7) ^{a,b}	1728 (40,1)	1265 (19,4) ^{a,b}	0,009
L1-HPV	545 (37,8)	1261 (65,7) ^a	1656 (66,2) ^a	1676 (62,9) ^a	1657 (58,1) ^a	0,000

n= mediana do número de núcleos positivos.

IM = mediana do Índice de Marcação (%)

*Teste Kruskal Wallis

Teste Mann-Whitney: Diferença estatística, em relação a C^a; NIC 1^b[§] n=146: participantes com ausência de epitélio escamoso foram excluídas desta análise.

Associação estatisticamente significativa também foi verificada entre o padrão de expressão da L1/HPV e o diagnóstico histopatológico (p=0,000). O IM de L1/HPV aumentou de C a NIC 2 (37,8% a 66,2%) e diminuiu em NIC 3 (62,9%) e CEI (58,1%). Diferença significativa foi observada entre o grupo cervicite e todos os demais grupos apresentando algum grau de lesão incluindo carcinoma (p=0,000).

O padrão de marcação IHQ de E7/HPV e L1/HPV pode ser observado na Figura 9. A oncoproteína E7/HPV mostrou marcação citoplasmática além da nuclear que foi quantificada. O mesmo foi observado para a proteína L1/HPV.

Em relação à pesquisa de HR-HPV (Figura 10), 92 amostras (61,3%) foram positivas para o DNA do HPV de alto risco e 58 (38,7%) foram negativas ou apresentaram tipos de baixo risco. O maior número de amostras negativas foi observado no grupo com diagnóstico de cervicite (86,7% HR-HPV negativas, 10% HPV 16 e 3,3% outros tipos de HPV de alto risco). Em NIC 1 e NIC 2 houve predomínio de outros tipos de HR-HPV (50,0% e 46,7%, respectivamente) enquanto em NIC 3 e CEI a presença de HPV 16 foi maior (53,3% e 50,0% respectivamente). Infecção simples por HPV 18 foi detectada apenas em amostras que apresentavam NIC 3 (3,3%) e CEI (6,7%).

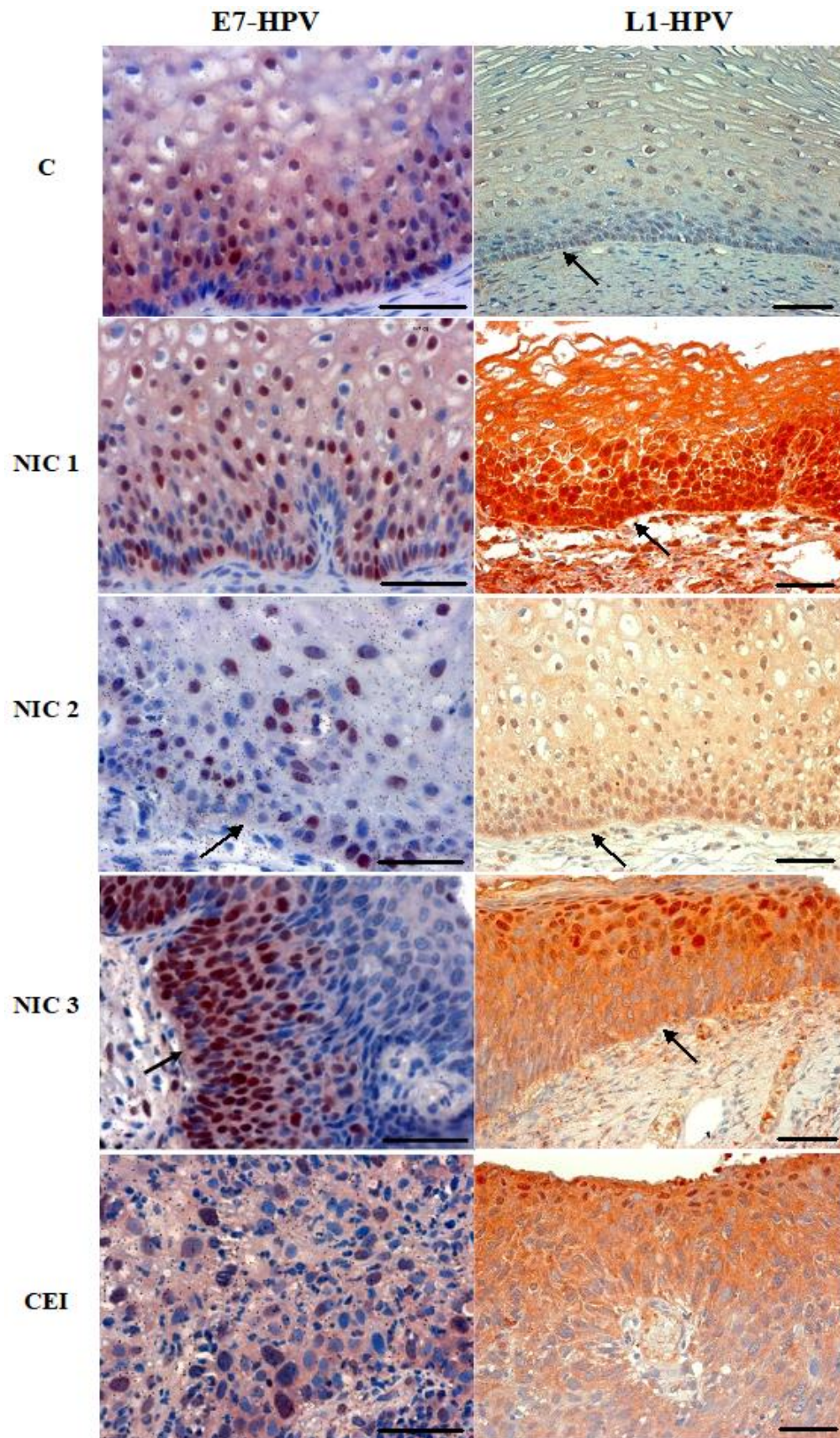


Figura 9. Padrão de marcação observado na imunoistoquímica utilizando os anticorpos anti-E7/HPV e anti L1/HPV. Cervicite (C); Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 1 (NIC 1); Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 2 (NIC 2); Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 3 (NIC 3); Carcinoma Epidermóide Invasor (CEI). As fotomicrografias de L1/HPV foram cedidas por Pitol (2012) e colocadas nesta figura para comparação com E7/HPV. Barra = 50 μ m. As setas indicam o epitélio escamoso.

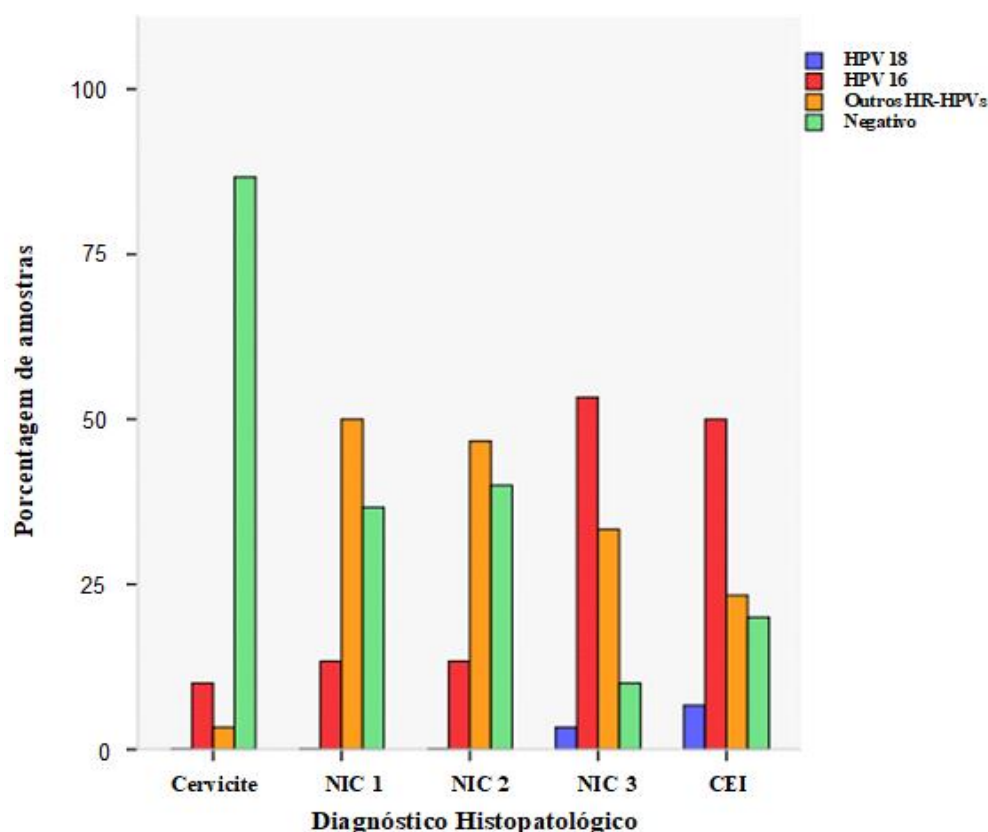


Figura 10. Representação gráfica dos resultados da pesquisa de HR-HPV pela técnica de PCR tempo real de acordo com o diagnóstico histopatológico. **Negativo:** amostras negativas para HR-HPV; **HPV 16:** este grupo incluiu amostras com infecção viral simples e múltipla (HPV16/outros HPV's ou HPV16/HPV18/outros HPV's); **Outros HR-HPV** detectados pela técnica utilizada: HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68. NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical; CEI: Carcinoma Epidermoide Invasor.

Os casos de infecção múltipla com HR-HPVs representavam 4,7% (n=7) das amostras e, em todos eles o HPV 16 estava presente, sendo 2 em cervicite, 1 em NIC1 e em NIC2 e 3 em CEI. Na amostra com infecção múltipla em NIC 1 foi detectado, além do HPV 16, o HPV 18 e outros tipos de HR-HPV e nas demais lesões apenas HPV 16 e outros tipos de HR-HPV. Não houve casos de infecção múltipla nas amostras de NIC 3.

A Tabela 12 compara as amostras que tiveram resultado positivo para a pesquisa de proteínas e de DNA do HPV por técnicas imunoistoquímicas e moleculares em relação ao diagnóstico histopatológico. A detecção de HPV por PCR convencional/SPF nas mesmas amostras deste estudo foi realizada por Silva (2015) e foi apresentada na tabela apenas para comparação com as demais técnicas. Foi encontrada associação da infecção por HPV (PCR convencional/SPF; $p=0,015$) e por HR-HPV (PCR tempo real; $p=0,000$) com o diagnóstico histopatológico, sendo esta infecção menos frequente nos casos de cervicite. Quando consideramos apenas os tipos virais de alto risco (HR-HPV), a positividade foi maior em NIC 3 (90%) e CEI (80,0%).

Tabela 12: Frequência de amostras com resultado positivo para a pesquisa de proteínas e de DNA do HPV por técnicas imunoistoquímicas e moleculares em relação ao diagnóstico histopatológico

Técnica usada para pesquisa de proteínas ou DNA do HPV	Diagnóstico Histopatológico					Total	p*
	C	NIC 1	NIC 2	NIC 3	CEI		
IHQ – E7/HPV**							
n	17	22	15	19	13	85	0,123
(%)	(65,4)	(73,3)	(50,0)	(63,3)	(43,3)		
IHQ – L1/HPV**							
n	24	29	28	28	25	134	0,160
(%)	(80,0)	(97,7)	(93,3)	(93,3)	(83,3)		
PCR tempo real (HR-HPV)							
n	4	19	18	27	24	92	0,000
(%)	(13,3)	(63,3)	(60,0)	(90,0)	(80,0)		
PCR convencional (SPF)							
n	26	30	29	30	30	145	0,015
(%)	(86,7)	(100,0)	(97,7)	(100,0)	(100,0)		
Total	54	78	75	85	79		

n= número de mulheres; %=porcentagem de mulheres

*Teste qui-quadrado de Pearson

**Amostras foram consideradas positivas para E7 quando apresentavam IM >31% e para L1/HPV quando apresentavam IM >25%.

C: Cervicite; NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical; CEI: Carcinoma Epidermoide Invasor.

Embora tenha sido observada diferença significativa na expressão de E7/HPV e L1/HPV em relação ao diagnóstico histopatológico (Tabela 11), quando se definiu um ponto de corte para avaliação dessas proteínas comparativamente à análise do DNA do HPV não se observou essa mesma associação (Tabela 12).

Um fato intrigante foi a elevada imunorreatividade de E7/HPV nas amostras de cervicite e de lesões de baixo grau (Tabela 11 e 12). Assim, decidiu-se analisar a associação da oncoproteína E7/HPV com a presença ou não de HR-HPV. Para as demais análises de associação deste trabalho foram feitas as seguintes considerações:

- Todos os tipos de HPV de alto risco detectados pela técnica utilizada neste trabalho foram reunidos em um grupo denominado HR-HPV, apesar desta metodologia possibilitar a identificação de HPV 16, HPV 18 e outros tipos de alto risco. A mesma análise foi realizada com HPV 16, mas os resultados foram similares e, portanto, não foram apresentados.

- Foi determinado um ponto de corte para análise de E7/HPV usando a curva ROC. Este ponto foi IM 31%. Assim, amostras que apresentaram IM > 31% foram consideradas E7/HPV positivas e aquelas com IM \leq 31% foram definidas como negativas.

- As amostras foram divididas em quatro grupos: E7-/HRHPV- (IM de E7/HPV \leq 31% e ausência de infecção por HR-HPV), E7-/HRHPV+ (IM de E7/HPV \leq 31% e presença de infecção por HR-HPV), E7+/HRHPV- (IM de E7/HPV > 31% e ausência de infecção por HR-HPV) e E7+/HRHPV+ (IM de E7/HPV > 31% e presença de infecção por HR-HPV).

A tabela 13 mostra os resultados obtidos a partir desta análise. A expressão da oncoproteína E7 do HPV e a presença de HR-HPV foram estatisticamente associadas ao diagnóstico histopatológico ($p=0,000$). De modo geral, em todos os graus de neoplasia, houve predomínio do padrão E7+/HRHPV+, ou seja, expressão aumentada da oncoproteína E7 associada à presença de HR-HPV. Para CEI os padrões predominantes foram E7-/HRHPV+ e E7+/HRHPV+. Por outro lado, no grupo C, os padrões mais encontrados foram E7-/HRHPV- (30,8%) e E7+/HRHPV- (57,7%).

Tabela 13: Análise da expressão de E7/HPV e da presença ou não de HR-HPV de acordo com o diagnóstico histopatológico

HR-HPV	Diagnóstico Histopatológico					Total	p
	C	NIC1	NIC2	NIC3	CEI		
E7-/HRHPV-							
n	8	4	8	2	4	26	
(%)	(30,8)	(13,3)	(26,7)	(6,7)	(13,3)		
E7-/HRHPV+							
n	1	4	7	9	13	34	
(%)	(3,8)	(13,3)	(23,3)	(30,0)	(43,3)		
E7+/HRHPV-							0,000*
n	15	7	4	1	1	28	
(%)	(57,7)	(23,3)	(13,3)	(3,3)	(3,3)		
E7+/HRHPV+							
n	2	15	11	18	12	58	
(%)	(7,7)	(50,0)	(36,7)	(60,0)	(40,0)		
Total	26	30	30	30	30	146	

n= número de mulheres; %=porcentagem de mulheres por lesão

*Teste qui-quadrado de Pearson

E7 (-): amostra com IM \leq 31%; HR-HPV (-): ausência de infecção por HR-HPV ou infecção por tipos de baixo risco.

E7 (+): amostra com IM >31%; HR-HPV (+): presença de infecção por HR-HPV

5.4) Análise da expressão de proteínas de ciclo celular e de proliferação e sua relação com a infecção por HPV e o com o diagnóstico histopatológico

A Tabela 14 mostra os resultados da expressão das proteínas de ciclo celular e de proliferação de acordo com a infecção por HR-HPV e com a imunorreatividade de E7/HPV.

A expressão de pRb foi menor nas amostras que apresentaram HR-HPV positivo e maior naquelas E7/HPV positivo e E7+/HRHPV+. No entanto, diferença significativa foi observada apenas na expressão de pRb em função da positividade de E7/HPV ($p=0,003$). Resultados similares foram obtidos na análise de p53. Por outro lado, houve expressão significativamente maior da proteína p16 nas amostras HR-HPV positivo ($p=0,000$) e naquelas E7+/HRHPV+ ($p=0,000$).

Em relação às proteínas de proliferação, foi encontrado aumento da expressão de Ki-67 e de PCNA nas amostras HR-HPV positivo, E7/HPV positivo e E7+/HRHPV+, sendo esta diferença significativa em todos os casos para Ki-67 e apenas em HR-HPV para PCNA (Tabela 14).

Tabela 14. Expressão das proteínas de ciclo celular e de proliferação de acordo com a infecção por HR-HPV e positividade de E7.

Proteína	HPV n (IM ou IP)								
	HR-HPV			E7			E7/HRHPV		
	Negativo	Positivo	p^*	Negativo	Positivo	p^*	E7-/HRHPV-	E7+/HRHPV+	p^*
pRb	156 (7,4)	152 (5,5)	0,087	67 (2,4)	217 (8,2)	0,003	115 (5,0)	208 (7,4)	0,328
p53	1137 (62,1)	1307 (57,9)	0,812	1126 (55,6)	1254 (62,6)	0,016	1088 (57,3)	1332 (61,2)	0,428
p16	253 (18,3)	1077 (55,3)	0,000	810 (42,2)	752 (49,8)	0,248	393 (27,2)	1065 (60,2)	0,000
Ki-67	22 (0,9)	156 (4,2)	0,000	25,5 (1,0)	97 (3,8)	0,017	13 (0,4)	166 (4,9)	0,000
PCNA	1194 (56,7)	1879 (67,9)	0,007	1586 (64,4)	1461 (65,5)	0,476	1140 (56,8)	1912 (70,6)	0,078

n= mediana do número de núcleos positivos

IM = mediana do Índice de Marcação (%)

*Teste Mann-Whitney

E7 (-): amostra com IM $\leq 31\%$; HR-HPV (-): ausência de infecção por HR-HPV ou infecção por tipos de baixo risco.

E7 (+): amostra com IM $> 31\%$; HR-HPV (+): presença de infecção por HR-HPV.

Na tabela 15 foram feitas as mesmas associações mostradas na tabela 14, porém considerando também os resultados do diagnóstico histopatológico. C/NIC1 e NIC3/CEI foram agrupados visando melhor análise.

Tabela 15: Expressão das proteínas de ciclo celular e de proliferação de acordo com a infecção por HR-HPV, positividade de E7 e o diagnóstico histopatológico.

Proteínas	Diagnóstico Histopatológico				<i>p</i> *
	HPV	C/NIC 1	NIC 2	NIC 3/CEI	
n (IM ou IP)					
pRb	HR-HPV positivo	297 (15,3)	471 (24,5)	90 (2,4) ^{a,b}	0,000
	E7/HPV positivo	336 (15,1)	417 (23,8)	122 (4,3) ^{a,b}	0,000
	E7+/HR-HPV+	336 (19,1)	417 (18,5)	121 (4,0) ^{a,b}	0,001
p53	HR-HPV positivo	1123 (58,7)	1265 (70,1)	1444 (55,5) ^{a,b}	0,044
	E7/HPV positivo	1123 (61,1)	1275 (70,9)	1444 (60,0)	0,051
	E7+/HR-HPV+	1077 (56,1)	1332 (70,9)	1589 (60,6)	0,149
p16	HR-HPV positivo	680 (36,7)	867 (49,5)	1671 (67,8) ^a	0,004
	E7/HPV positivo	253 (17,7)	920 (54,3)	1582 (69,6) ^a	0,000
	E7+/HR-HPV+	602 (36,3)	920 (57,9)	1635 (69,7) ^a	0,004
Ki-67	HR-HPV positivo	148 (4,8)	58,5 (2,0)	158 (4,0)	0,410
	E7/HPV positivo	52 (2,1)	82 (3,7)	236 (5,0)	0,106
	E7+/HR-HPV+	151 (5,0)	82 (3,0)	251 (5,2)	0,579
PCNA	HR-HPV positivo	1361 (65,5)	1879 (73,2)	2338 (66,3)	0,101
	E7/HPV positivo	1156 (56,7)	1912 (76,0) ^a	2560 (64,9) ^{a,b}	0,001
	E7+/HR-HPV+	1306 (66,0)	1912 (76,0)	2694 (66,4)	0,055

n= mediana do número de núcleos positivos.

IM = mediana do Índice de Marcação (%)

*Teste Kruskal Wallis

Teste Mann-Whitney: Diferença estatística, em relação a C/NIC 1 ^a; NIC 2 ^b

A expressão de pRb nas lesões NIC3/ CEI foi significativamente menor do que nas lesões menos graves (C/NIC1 p=0,001; NIC2 p=0,000) nas amostras HR-HPV

positivo, E7/HPV positivo (C/NIC1 $p=0,003$; NIC2 $p=0,000$) e E7+/HRHPV+ (C/NIC1 $p=0,006$; NIC2 $p=0,001$) (Tabela 15).

Para a proteína p53 os resultados foram similares àqueles de pRb com menor expressão em amostras NIC3/CEI infectadas com HR-HPV, E7/HPV+ e E7+/HRHPV+. No entanto, diferença significativa foi observada somente de amostras NIC3/CEI para C/NIC 1 ($p=0,044$) e NIC2 ($p=0,048$) infectadas com HR-HPV.

Por outro lado, os dados de p16 mostraram maior expressão dessa proteína em amostras NIC3/CEI HR-HPV+ ($p=0,004$), E7/HPV+ ($p=0,000$) e E7+/HRHPV+ ($p=0,004$) comparativamente a C/NIC1, mas não a NIC2 (Tabela 15).

Em relação às proteínas de proliferação, a expressão de Ki-67 não foi associada com o diagnóstico histopatológico, enquanto a de PCNA aumentou significativamente em amostras E7/HPV positivas apresentando NIC2 e NIC3/CEI ($p=0,001$). A maior expressão de PCNA esteve em NIC2 e NIC3/CEI para qualquer situação avaliada.

5.5) Análise do desempenho diagnóstico dos testes moleculares e imunoistoquímicos das proteínas de ciclo celular, de proliferação e virais.

O desempenho dos testes imunoistoquímicos e moleculares das proteínas e do DNA, isolados ou em associação, foram avaliados através dos cálculos de sensibilidade, especificidade, acurácia e a área sob a curva ROC.

Os cálculos foram feitos considerando o diagnóstico histopatológico agrupado em 3 categorias:

- **NIC 1 +**: avaliou todos os graus NIC comparativamente a cervicite;
- **NIC 2 +**: avaliou NIC2/NIC3/CEI em comparação a cervicite/NIC1;
- **NIC 3 +**: avaliou NIC3/CEI em relação a C/NIC1/NIC2

A tabela 16 mostra os resultados dos testes de desempenho diagnóstico.

Para avaliar NIC 1+ isoladamente, p16 e HR-HPV mostraram os melhores testes: sensibilidade e especificidade altas e área sob a curva ROC (ASC) mais próxima de 1, refletindo maior acurácia diagnóstica (NIC1+: 84,0% p16 e 76,0% HR-HPV).

A associação de pRb com p16 (NIC1+: $A=87,0\%$) e com HR-HPV (NIC1+: $A=80,8\%$) também apresentaram resultados satisfatórios. Para NIC2+ a associação de

pRb com L1/HPV também mostrou boa acurácia (80,1%). Por outro lado, nenhum dos testes isolados ou associados foi eficaz para avaliar NIC3+.

Tabela 16: Análise do desempenho dos testes moleculares e imunoistoquímicos das proteínas de ciclo celular, de proliferação e virais, isoladas ou em associação.

Testes*	NIC1+				NIC2+				NIC3+			
	S	E	A	ASC	S	E	A	ASC	S	E	A	ASC
pRb	48,3	76,9	53,4	0,624	53,3	71,4	60,3	0,621	65,0	70,9	68,5	0,684
p16	83,3	86,7	84,0	0,850	83,3	53,3	71,3	0,684	88,3	44,4	62,0	0,665
PCNA	79,0	53,3	73,8	0,664	82,0	41,7	65,8	0,615	78,3	31,5	50,3	0,545
L1/HPV	91,7	20,0	77,4	0,558	90,0	11,7	58,7	0,503	88,3	10,0	41,3	0,489
E7/HPV	56,7	34,6	52,7	0,459	51,1	30,4	43,2	0,410	51,7	37,2	43,2	0,441
HR-HPV	73,3	86,7	76,0	0,808	76,7	61,7	70,7	0,686	85,5	54,5	67,3	0,696
pRb/p16	90,8	69,2	87,0	0,800	92,2	39,3	71,9	0,658	95,0	30,2	56,9	0,626
pRb/PCNA	93,3	38,5	83,5	0,659	97,8	28,6	71,0	0,632	96,7	18,8	51,0	0,577
pRb/p16/PCNA	68,1	90,0	72,5	0,790	70,8	65,0	68,5	0,679	71,7	53,9	61,1	0,628
pRb/E7	85,0	26,9	74,7	0,560	84,4	19,6	59,6	0,520	88,3	20,9	50,7	0,546
pRb/HR-HPV	84,2	65,4	80,8	0,748	87,8	44,6	71,2	0,662	93,3	37,2	60,3	0,653
pRb/L1	78,3	57,7	74,4	0,680	92,2	60,7	80,1	0,765	100,0	47,7	69,2	0,738
L1/E7	94,2	7,7	78,8	0,509	92,2	3,6	57,5	0,479	89,8	3,4	38,4	0,467
L1/HR-HPV	66,7	86,7	76,7	0,767	67,8	61,7	65,0	0,647	75,0	56,7	64,0	0,658
E7/HR-HPV	45,0	92,3	53,4	0,687	43,3	69,6	53,4	0,565	46,7	67,4	58,9	0,571
L1/E7/HR-HPV	67,5	86,7	71,3	0,780	68,9	61,7	66,0	0,648	75,0	55,6	63,3	0,648

* Os pontos de corte utilizados para as proteínas avaliadas foram: 5% pRb; 25% p16; 50% PCNA; 25% L1 e 31% E7
S= Sensibilidade; E= Especificidade; A= Acurácia; ASC= Área sob a Curva ROC

6) DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi avaliada a expressão de proteínas de ciclo celular e de proliferação e sua associação com a infecção por HPV e com o diagnóstico histopatológico. Assim, as proteínas pRb e ki-67 foram processadas por imunohistoquímica, analisadas e comparadas à outras proteínas de ciclo celular (p16, p53) e de proliferação (PCNA) anteriormente avaliadas no mesmo material biológico, ao status de infecção por HR-HPV e a expressão da oncoproteína E7HPV nas cervicites, lesões neoplásicas de baixo e alto grau e no câncer invasivo do colo do útero. O desempenho diagnóstico dos testes moleculares e da IHQ destas proteínas e do DNA do HPV foi avaliado, considerando os testes isolados ou associados, buscando possíveis marcadores da gravidade das lesões intraepiteliais cervicais.

Infecção por HPV

A presença de HPV e de HR-HPV foi associada com o diagnóstico histopatológico. Foi observada alta positividade do HPV nas amostras, mesmo naquelas com diagnóstico de cervicite. No entanto, como era esperado, houve maior frequência de HR-HPV nas lesões de maior gravidade (NIC3 e CEI) (Xing, Wang & Wu, 2017). HPV16 foi o tipo de vírus mais frequente nas lesões mais graves e HPV18 foi detectado apenas nestas lesões, como já havia sido descrito em outros trabalhos (Nam *et al.*, 2008; Conesa-Zamora *et al.*, 2009; Schiffman & Wentzensen, 2013; Tornesello *et al.*, 2013).

A comparação dos resultados obtidos na PCR convencional que detecta HPV genérico, com aqueles gerados pela PCR tempo real que avalia 14 tipos de HR-HPV, sugere que em C, NIC1 e NIC2 estejam presentes tipos virais de baixo risco oncogênico (LR-HPV) ou outros tipos de alto risco não detectados pelo teste utilizado. Isto é reforçado pelos resultados obtidos na análise IHQ de L1/HPV e de E7/HPV, que também mostraram alta expressão destas proteínas virais em C, NIC1 e NIC2, indicando presença de HPV nestas amostras. Na análise de L1/HPV, o anticorpo utilizado detecta 11 tipos de HPV, incluindo baixo e alto risco (HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 51, 52, 56 e 58). O anticorpo utilizado na IHQ de E7/HPV permite detectar esta oncoproteína do HPV16, mas como a positividade foi elevada mesmo em amostras onde não foi detectado HPV16, possivelmente a oncoproteína E7 de outros tipos virais também apresentaram imunorreatividade.

A análise IHQ utilizando anticorpos contra as proteínas virais (E7 e L1) foi avaliada para obter informações sobre a fase da infecção por HPV: produtiva ou de transformação, buscando auxiliar no diagnóstico.

A L1 é uma proteína do capsídio do HPV, expressa tardiamente nas camadas mais diferenciadas do epitélio e, portanto, sua presença tem sido considerada a principal evidência da infecção “produtiva”. Na fase de “transformação”, quando ocorre a integração do DNA do HPV ao da célula hospedeira, a expressão da L1 é gradualmente suprimida (Hilfrich & Hariri, 2008; Steenbergen *et al.*, 2014; Araldi *et al.*, 2015). A expressão de L1/HPV, neste trabalho, mostrou associação com o diagnóstico histopatológico, sendo menos expressa nas cervicites quando comparada aos casos com lesão ou carcinoma. Esse achado indica que a expressão de L1 está relacionada com a infecção por HPV, mas não contribui para determinar a fase da infecção. Quando se determinou um ponto de corte para L1/HPV a diferença no IM desta proteína nos diferentes graus de lesão não foi significativa, o que pode dificultar seu uso na rotina diagnóstica. Resultados similares foram obtidos por outros autores (Yoshida *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010; Faoro *et al.*, 2013)

Por outro lado, em princípio, esperava-se aumento da expressão de E7/HPV com a gravidade da lesão, porém, neste trabalho, houve diminuição na expressão da oncoproteína E7/HPV em NIC2, NIC3 e CEI comparativamente a C/NIC1. No intuito de melhor entender este resultado, foi avaliada E7/HPV conjuntamente a HR-HPV. Esta análise mostrou predomínio do padrão E7+/HRHPV+ em todos os graus de lesão (NIC 1, 2 e 3) sugerindo que a expressão aumentada da oncoproteína E7 está associada à presença de HR-HPV, esse padrão também foi visto em 40% das amostras de CEI. O padrão E7+/HRHPV- foi o mais frequente em cervicite, reforçando a alta expressão de E7 nestas amostras.

Faoro e colaboradores (2013), também encontraram diferença estatística entre os casos de NIC de baixo grau e carcinoma utilizando Cervimax, anticorpo anti-E7 desenvolvido por seu grupo. Semelhantes aos nossos achados, estes pesquisadores relataram menor positividade para E7/HPV nas amostras de câncer e sugeriram que esta oncoproteína pode ser a principal responsável pela iniciação e promoção da infecção, mas não pela sua progressão. Uma marcação reduzida ou não detectável de E7/HPV pode indicar pouca ou nenhuma atividade replicativa (Faoro *et al.*, 2013), o que explicaria a baixa imunorreatividade de E7/HPV nos casos de carcinoma invasivo, pois

a maioria dos cânceres cervicais não se apresentam como uma displasia ativa e, portanto, a expressão de proteínas do HR-HPV na doença seria limitada (Sarwath *et al.*, 2017). Pim e colaboradores (2012) também sugeriram que ambas oncoproteínas virais (E7 e E6) são necessárias durante o desenvolvimento da malignidade, mas que seria E7 a responsável pelos principais efeitos de iniciação ao tumor, justificando sua expressão mais elevada nos estágios anteriores ao câncer.

Neste estudo, a expressão de E7/HPV foi elevada em cervicite, mesmo em amostras que não apresentaram HR-HPV. Isto pode ter ocorrido devido ao anticorpo utilizado na IHQ ou a baixa sensibilidade neste teste. Também pode ser que algumas amostras com cervicite apresentem outros tipos de HR-HPV não detectados pelo teste usado neste estudo. Roncaglia e colaboradores (2013), utilizando um anticorpo contra E6 de HPVs 16 e 18 em amostras obtidas por conização, também não observaram aumento da expressão desta oncoproteína nas amostras com lesões NIC2 ou mais graves e atribuíram o resultado à baixa sensibilidade da avaliação IHQ de E6. De maneira semelhante, nossos resultados apontam uma baixa sensibilidade para o teste IHQ de E7/HPV (variando de 51,1% a 56,7%).

Por outro lado, Ramirez e colaboradores (2015), utilizando um anticorpo anti E7 HPV16 produzido pelo seu grupo de pesquisa, encontraram um padrão de marcação forte e difuso para E7/HPV nos casos de câncer e HSIL comparados a uma imunomarcação menor e menos intensa nas lesões de baixo grau. Eles propuseram a utilização da oncoproteína E7 como marcador da progressão de LSIL para HSIL (Ramirez *et al.*, 2015).

O anticorpo primário utilizado é determinante na IHQ. Neste trabalho foi utilizado o anticorpo anti-E7 HPV16 (Abcam, Cambridge, MA). Conforme citado anteriormente, Faoro e colaboradores (2013) e Ramirez e colaboradores (2015) utilizaram na IHQ anticorpos primários anti-E7 produzidos pelos seus próprios grupos de pesquisa, não anticorpos comerciais. Neste sentido, também vale destacar que neste trabalho não foi possível avaliar a expressão da oncoproteína E6/HPV utilizando o anticorpo primário anti E6 HPV 16/18 do mesmo fabricante (Abcam, Cambridge, MA). Stiasny e colaboradores (2016) avaliaram E6/HPV em amostras de NIC3 e carcinoma utilizando este anticorpo comercial e a presença da oncoproteína foi demonstrada por intensa coloração do citoplasma das células tumorais, apesar de coloração nuclear ausente.

A falta de padronização do teste IHQ também pode estar associada aos resultados discrepantes dos estudos. Os escores de marcação adotados pelos poucos trabalhos que avaliam a expressão IHQ de E7/HPV nas NICs (Faoro *et al.*, 2013; Roncaglia *et al.*, 2013; Ramirez *et al.*, 2015; Stiasny *et al.*, 2016) utilizam critérios de interpretação e de pontuação diferentes que podem considerar marcação nuclear e citoplasmática ou apenas nuclear, além de poder levar em conta a localização e intensidade da imunomarcação. Tanto neste estudo como no de Roncaglia e colaboradores (2013), foram avaliadas apenas a marcação nuclear, embora marcação citoplasmática tenha sido observada. Significativa imunorreatividade citoplasmática foi demonstrada por Dantur e colaboradores (2009) em células transformadas por HPV.

Além de todas as colocações acima, também é importante considerar que embora muitos estudos tenham relatado aumento da expressão dos oncogenes virais E6 e E7 no CC, pensa-se agora que a progressão ao câncer pode ocorrer independentemente desses genes. Evidências sugerem que mecanismos como a integração viral é responsável por alterações genéticas que iniciam a tumorigênese, propondo-a como uma mutação condutora na progressão da lesão, sem depender da expressão dos oncogenes E6 e E7. Além disso, o envolvimento de mecanismos epigenéticos que afetam a expressão de genes-chave no processo de transformação tumoral, inibindo a expressão de genes supressores de tumor no genoma do hospedeiro ou aumentando a expressão de genes para a produção de novas partículas virais, ainda é desconhecida (Oyervides-Muñoz *et al.*, 2018).

Expressão das proteínas do ciclo celular

No presente estudo a imunorreatividade de pRb foi menor em lesões cervicais de alto grau e no câncer, sugerindo a existência de uma correlação inversa entre a expressão da proteína e a gravidade da lesão, tal observação foi compartilhada por outros autores (Nam *et al.*, 2007; Bahnassy *et al.*, 2007; Son *et al.*, 2012). Este mesmo resultado foi observado quando se avaliou a associação de pRb com o HR-HPV. A diminuição nos níveis celulares de pRb é explicada pela interação desta com a proteína E7 do HPV de alto risco, o complexo formado pelas duas proteínas conduz à degradação de pRb e impossibilita sua ligação ao fator de transcrição E2F (Baak *et al.*, 2006; Doorbar, 2007; Tomaic, 2016). Porém, neste estudo, isto não foi verificado quando se avaliou a expressão de pRb comparativamente à de E7/HPV, pois foi observado aumento de pRb quando IM de E7/HPV foi > 31%. Para melhor entender

este resultado, foi realizada análise de associação de pRb com E7/HPV, HR-HPV e E7/HRHPV considerando o diagnóstico histopatológico. Esta análise permitiu entender que a correlação de pRb com E7/HPV depende do grau da lesão. Em NIC3/CEI a expressão de pRb foi significativamente menor nas amostras que apresentaram HR-HPV, naquelas positivas para E7/HPV (IM>31%) e naquelas positivas para ambos (E7 e HR-HPV) do que em C/NIC1 e NIC2.

A proteína p16 é amplamente estudada como biomarcador das lesões pré-neoplásicas e do câncer cervical (Klaes *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004; Kanthiya *et al.*, 2016; Xing, Wang e Wu, 2017; Liu *et al.*, 2017; Zhang & Shen, 2018) e já vem sendo utilizado na prática clínica (Schiffman & Wentzensen, 2013; Castle, 2013; Clinton *et al.*, 2015; Bergeron & Doeberitz, 2016). Sabe-se que a expressão de p16 aumenta com a gravidade da lesão (Son *et al.*, 2012; Pitol, 2012; Alshenawy *et al.*, 2014). Neste estudo, os resultados da IHQ de p16 foram comparados com aqueles de pRb, E7/HPV e HR-HPV. Assim, observou-se que p16 foi significativamente mais expressa nas lesões mais graves comparadas a C/NIC1 nas amostras que apresentaram E7/HPV+, HR-HPV e E7+/HRHPV+. Conforme descrito acima E7/HPV se liga a pRb e libera o fator de transcrição E2F. Este fator livre, ativa a transcrição do gene da p16 e de outros necessários à progressão do ciclo celular (Wang, 2006). Além disso, o controle da expressão da proteína p16, que é regulada por retroalimentação negativa dependente de pRb, também fica prejudicado. Assim, em resposta à inativação contínua de pRb por E7, as células infectadas com HPV oncogênico apresentam níveis aumentados de p16 que acaba se acumulando ao longo do tempo (Baak *et al.*, 2006; Doorbar, 2006; Martin & O'leary, 2011). O acúmulo de p16 torna-se cada vez mais acentuado à medida que a lesão progride e essa característica tem incentivado seu uso como marcador do grau da lesão (Lambert, Anschau & Schmitt, 2006; Cheah, *et al.*, 2012; Tornesello *et al.*, 2013).

Os resultados deste trabalho indicaram uma relação inversa nos níveis de pRb e p16 principalmente em NIC 3/CEI infectadas com tipos de HPV oncogênicos e/ou positivos para E7. Esse padrão de expressão pode estar associado ao risco de progressão da lesão.

Tem-se avaliado a utilidade de p16 também em prever a infecção por HPV. Nam e colaboradores (2008) verificaram que a expressão de p16 foi menor na ausência de infecção por HR-HPV, especialmente em NIC1. Neste estudo, as lesões de baixo grau, bem como as cervicites, também apresentaram expressão de p16 estatisticamente menor

nos casos negativos para HPV ou apresentando infecção por algum tipo de baixo risco em relação às amostras positivas para HR-HPV (dados não mostrados). Os resultados deste trabalho também sugerem que p16 pode funcionar como marcador de infecção por HR-HPV, uma vez que amostras infectadas apresentaram expressão significativamente maior dessa proteína. No entanto, a sua expressão parece não estar alterada somente na infecção por vírus de alto risco oncogênico (Galgano *et al.*, 2010; Hwang & Shroyer, 2011; Cheah, *et al.*, 2012; Tornesello *et al.*, 2013). Amaro-Filho e colaboradores (2013), avaliando a p16 observaram que sua expressão foi evidenciada em células claramente não-displásicas e que, portanto, sua detecção em lesões cervicais não deve ser considerada como prova isolada da infecção por HPV de alto risco. Estudos recentes (Zhang *et al.*, 2015; Xing, Wang & Wu, 2017) afirmaram que p16 não é um marcador substituto confiável do status de infecção por HPV.

A outra proteína de ciclo celular avaliada foi p53. Não foi encontrada associação entre a expressão de p53 e a infecção por HR-HPV, mas a sua expressão em lesões graves e no carcinoma foi significativamente diminuída em amostras infectadas por HR-HPV. Esse resultado foi consistente com outros estudos (Vassallo *et al.*, 2000; Portari *et al.*, 2013; Mitildzans *et al.*, 2016). A diminuição da marcação de p53 em lesões graves suporta a ideia de que a oncoproteína E6 dos HR-HPVs promove a ubiquitinação desse supressor e o conduz à degradação pelo proteassoma. No entanto, Doorbar (2005) afirmou que a inativação de p53 por E6 não é um fenômeno fácil de ser rastreado por teste imunoistoquímico. Assim, os dados sobre a IHQ de p53 são conflitantes, algumas pesquisas mostraram o aumento de expressão de p53 em células transformadas devido à alta taxa de mutação da proteína (Bahnassy *et al.*, 2007; Amaro-Filho *et al.*, 2013; Mitildzans *et al.*, 2016), enquanto em outros não foi observada nenhuma associação com o diagnóstico histopatológico (Son *et al.*, 2012; Portari *et al.*, 2013). O baixo índice de concordância entre os estudos com IHQ de p53 até o momento parece indicar pouca utilidade dessa proteína como ferramenta auxiliar no diagnóstico do câncer cervical.

Expressão das proteínas de proliferação

A ausência da inibição efetiva da progressão do ciclo celular por p16 e seu acúmulo nas células resulta em elevação nos níveis de proteínas associadas com a proliferação, tais como Ki-67 e PCNA, ao longo das camadas epiteliais infectadas (Doorbar, 2012). Localizada no núcleo, a proteína ki-67 é expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0 (Arisawa *et al.*, 1999) e seu uso como marcador de

proliferação já está bem estabelecido na literatura (Sahasrabuddhe, Luhn & Wentzensen, 2011; Sun *et al.*, 2018). Neste trabalho, a expressão da proteína variou positivamente com o avanço da lesão como tem sido observado em vários estudos (Gatta *et al.*, 2011; Son *et al.*, 2012; Goel *et al.*, 2013; Alshenawy, 2014; Mitildzans *et al.*, 2016; Kanthiya *et al.*, 2016; Xing, Wang & Wu, 2017) e foi estatisticamente maior em NIC3/CEI comparada a cervicite e NIC2. PCNA também foi mais expressa em NIC3/CEI conforme esperado.

Mitildzans e colaboradores (2016) observaram que ki-67 poderia distinguir condições normais e benignas do colo do útero das lesões precursoras do câncer. Neste estudo foi demonstrado que, apesar de não ter variado linearmente com o grau da lesão, ki-67 pôde distinguir lesões não-displásicas e NIC2 de casos mais graves. O grupo de Xing *et al* (2017), no entanto, mostrou resultados contrários a esses, aceitando que a marcação imunoistoquímica de ki-67 não é muito precisa para ajudar na distinção entre NIC1 e lesões mais graves.

Foi verificada associação estatística de ki-67 com a infecção por HR-HPV neste estudo. Esses resultados indicam que a inativação da pRb em células infectadas por HR-HPV e o consequente aumento de E2F livre na célula estaria levando ao aumento da proliferação celular que é marcada por níveis elevados de ki-67. Outros estudos não notaram essa correlação (Nam *et al.*, 2008; Mimica *et al.*, 2013; Zhong *et al.*, 2015)

Também já foi proposta a marcação com ki-67 e p16 para identificar alterações celulares, no entanto o método tem sido mais utilizado na citologia cervical (Wentzensen *et al.*, 2015; Uijterwaal *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2017).

Com relação à PCNA, nossos achados, assim como os descritos por Branca e colaboradores (2007) mostraram associação entre a infecção viral por HR-HPV e a expressão da proteína que esteve significativamente aumentada nesses casos. No entanto essa associação foi perdida quando calculada segundo o grau histológico, contrário aos resultados demonstrados por Branca e colaboradores (2007). Nós também verificamos presença de altos níveis de PCNA em casos sem alterações displásicas (cervicites) como já demonstrado em outros trabalhos (Wang *et al.*, 2004; Branca *et al.*, 2007). A expressão de PCNA em células proliferativas que não necessariamente apresentam características de malignidade pode limitar o uso dessa proteína na triagem do câncer cervical (Branca *et al.*, 2007). Por outro lado, a IHQ de PCNA associada a

outros métodos de diagnóstico das neoplasias, pode ser adequado para auxiliar na definição da gravidade da lesão (Wang *et al.*, 2004; Branca *et al.*, 2007), principalmente em casos classificados equivocadamente como lesão de baixo grau, mas que expressam alto índice de proliferação, como já afirmado anteriormente (Goel & Mehrotra, 2013).

Desempenho diagnóstico dos testes IHQ e moleculares para expressão de proteínas de ciclo celular e de proliferação e de DNA do HPV

A busca por possíveis marcadores da gravidade das lesões intraepiteliais cervicais é constante, pois tem sido descrita uma perda substancial na reprodutibilidade do diagnóstico das lesões neoplásicas cervicais em razão das características histológicas utilizadas para definir o grau das lesões (Son *et al.*, 2012). Além disso, não raramente, são relatadas dificuldades no diagnóstico principalmente entre NIC 2 e NIC 3, etapas determinantes para o manejo clínico das mulheres nos serviços de saúde (Galgano *et al.*, 2010).

Neste estudo, a análise do desempenho diagnóstico mostrou melhor área sob a curva e maior acurácia diagnóstica para os testes isolados de HR-HPV e p16 para avaliar NIC1+. Quanto maior o grau de lesão, maior foi a sensibilidade e menor a especificidade do teste isolado de HR-HPV. Outros estudos vêm mostrando a importância da inclusão do teste de HPV para o diagnóstico e prognóstico das lesões cervicais (Sahasrabudhe, Luhn & Wentzensen, 2011; Tornesello *et al.*, 2013; Stoler & Zhao, 2015).

Poucos trabalhos avaliaram o significado diagnóstico e prognóstico da proteína L1 na histologia e, embora sejam estudos relativamente pequenos, já foi sugerida a utilidade de L1 como marcador da fase da infecção viral e possível preditor do grau da lesão cervical (Hilfrich & Hariri, 2008; Pitol, 2012). No entanto, como demonstrado neste estudo, L1 isolada mostrou baixa especificidade em predizer a gravidade da NIC, o que poderia ser uma limitação do seu uso. O estudo de Galgano *et al.* (2010), mostrou que L1, além de não ser específica, foi também pouco sensível para a detecção de lesões NIC2/3. Mesmo quando o teste molecular de detecção de HR-HPV foi associado com a análise imunoistoquímica de L1/HPV bem como de E7/HPV não houve melhoria no desempenho diagnóstico.

Em relação às proteínas de ciclo celular, pRb e p16 apresentaram melhor desempenho diagnóstico. Em geral, o teste de pRb isolada apresentou maior

especificidade e menor sensibilidade, além de melhor acurácia para avaliação de lesões NIC3 ou mais graves (NIC3+). O teste IHQ de p16 isolado, ao contrário, mostrou alta sensibilidade e desempenho para análise de NIC1+ neste estudo, também foi muito sensível para distinguir NIC3+, mas a especificidade foi baixa. Isso está de acordo com estudos anteriores (Hariri & Oster, 2007; Conesa-Zamora *et al.*, 2009; Xing, Wang & Wu, 2017). A associação do teste de pRb com p16 mostrou desempenho satisfatório para NIC1+, no entanto, deve-se considerar o custo benefício da associação destes testes. O aumento de acurácia nesta associação pode não compensar o tempo e o recurso financeiro gasto na análise. Mais estudos, principalmente de acompanhamento com desfecho clínico, seriam importantes para auxiliar no melhor entendimento do uso associado destes marcadores. Vale destacar que o melhor desempenho diagnóstico da associação dos testes de pRb foi com L1/HPV para NIC2+ (A: 80,1%), com isso esta associação pode ser útil para acompanhar casos de lesões com chances de progressão. Não foram encontrados outros estudos que demonstrassem o desempenho de pRb na análise imunoistoquímica, isolado ou associado a p16.

Não foi calculado desempenho diagnóstico dos testes IHQ de ki-67 e p53, pois não se verificou associação significativa destas com a infecção por HPV, a expressão de E7/HPV e o diagnóstico histopatológico. Portanto, os resultados deste estudo, mostraram que ki-67 e p53 não foram biomarcadores úteis na avaliação dos graus de NIC e do CEI.

7) CONCLUSÃO

A análise do desempenho diagnóstico apontou maior acurácia para os testes isolados de HR-HPV e p16. A associação do teste imunoistoquímico de pRb com p16 também apresentou sensibilidade, especificidade, ASC e acurácia satisfatórias para o diagnóstico de NIC1+, enquanto a associação de pRb com L1/HPV apresentou bom desempenho para NIC2+. Ainda assim, deve-se considerar o custo benefício da associação destes testes.

HR-HPV, p16 e pRb, isolados ou associados, parecem ser úteis como possíveis marcadores auxiliando na diferenciação dos graus das lesões intraepiteliais cervicais.

8) REFERÊNCIAS

ABREU, A L P *et al.* A review of methods for detect human Papillomavirus infection. **Virology Journal**, v. 9, n. 1, p.262-271, 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422x-9-262>.

ALSHENAWY, H A. Evaluation of p16, human papillomavirus capsid protein L1 and Ki-67 in cervical intraepithelial lesions: Potential utility in diagnosis and prognosis. **Pathology - Research and Practice**, [s.l.], v. 210, n. 12, p.916-921, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2014.07.007>.

AMARO-FILHO S M *et al.* A Comparative Analysis of Clinical and Molecular Factors with the Stage of Cervical Cancer in a Brazilian Cohort. **PLoS ONE**, v 8, n.3, 2013: e57810. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057810>.

ARALDI, R P *et al.* Papillomaviruses: a systematic review. **Genetics and Molecular Biology**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.1-21, 16 fev. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0128>.

ARBYN, M *et al.* Are 20 human papillomavirus types causing cervical cancer? **The Journal of Pathology**, v. 234, n. 4, p.431-435, 11 nov. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/path.4424>.

ARISAWA, E A L, MORAES, E. **PCNA and Ki-67 cell-cycle makers: A brief review.** *Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos*, v.2, n.1, p. 54-60, jan./jun., 1999.

ASSIS, B L G. **Análise da Expressão de PCNA nas Lesões Intraepiteliais Cervicais e no Carcinoma.** 2015. 53 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.

BAAK, J P *et al.* Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. **Journal of Clinical Pathology**, [s.l.], v. 59, n. 10, p.1017-1028, 1 out. 2006. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2005.027839>.

BAHNASSY, A *et al.* The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. **Bmc Clinical Pathology**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-11, 24 maio 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6890-7-4>.

BARON, C *et al.* Relationship between HPV 16, 18, 31, 33, 45 DNA detection and quantitation and E6/E7 mRNA detection among a series of cervical specimens with various degrees of histological lesions. **Journal of Medical Virology**, [s.l.], v. 87, n. 8, p.1389-1396, 23 abr. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.24157>.

BERGERON, C *et al.* Quality control of cervical cytology in high-risk women. PAP-NET system compared with manual rescreening. **Acta Cytologica**, Chicago, v. 44, n. 2, p. 151-157, 2000.

BERGERON, C; DOEBERITZ, M K. The Role of Cytology in the 21st Century: The Integration of Cells and Molecules. **Acta Cytologica**, [s.l.], v. 60, n. 6, p.540-542, 2016. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000449402>.

BISHOP, J A *et al.* Detection of Transcriptionally Active High-risk HPV in Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma as Visualized by a Novel E6/E7 mRNA In Situ Hybridization Method. **The American Journal of Surgical Pathology**, [s.l.], v. 36, n. 12, p.1874-1882, dez. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/pas.0b013e318265fb2b>.

BOON, J A *et al.* Molecular transitions from papillomavirus infection to cervical precancer and cancer: Role of stromal estrogen receptor signaling. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 112, n. 25, p.3255-3264, 8 jun. 2015. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1509322112>.

BOULET, G *et al.* Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 11, p.2006-2011, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.004>.

BOUVARD V *et al.* A review of human carcinogens—Part B: biological agents. **The Lancet Oncology**, v. 55, n. 4, p. 321–322, 2009.

BOSCH, F X *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol**, v. 55, n. 4., p. 244-265, abril 2002.

BRAVO, I G; FELEZ-SANCHEZ, M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. **Evolution, Medicine, and Public Health**, v. 2015, n. 1, p.32-51, 28 jan. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/emph/eov003>.

BRANCA, M *et al.* Up-regulation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is closely associated with high-risk human papillomavirus (HPV) and progression of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), but does not predict disease outcome in cervical cancer. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, [s.l.], v. 130, n. 2, p.223-231, fev. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2006.10.007>.

CALIL, L N *et al.* P16INK4a and Ki-67 expression in normal, dysplastic and neoplastic uterine cervical epithelium and human papillomavirus (HPV) infection. **Pathology - Research and Practice**, v. 210, n. 8, p.482-487, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2014.03.009>.

CASTELLANOS, M R *et al.* Diagnostic imaging of cervical intraepithelial neoplasia based on hematoxylin and eosin fluorescence. **Diagnostic Pathology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.1-11, 25 jul. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13000-015-0343-8>.

CHEAH, P *et al.* Correlation of p16INK4a immunoexpression and human papillomavirus (HPV) detected by *in-situ* hybridization in cervical squamous neoplasia. **Malaysian J Pathol** v. 38, n. 1, p. 33-38, 2016. PMID:27126662.

CHEAH, P *et al.* P16INK4a is a Useful Marker of Human Papillomavirus Integration Allowing Risk Stratification for Cervical Malignancies. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, [s.l.], v. 13, n. 2, p.469-472, 29 fev. 2012. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention. <http://dx.doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.2.469>.

CHOI, Y J; PARK, J. Sup. Clinical significance of human papillomavirus genotyping. **Journal of Gynecologic Oncology**, v. 27, n. 2, p.1-12, 2016. Asian Society of Gynecologic Oncology; Korean Society of Gynecologic Oncology and Colposcopy (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.3802/jgo.2016.27.e21>.

DANTUR, K *et al.* Cytosolic accumulation of HPV16 E7 oligomers supports different transformation routes for the prototypic viral oncoprotein: The amyloid-cancer connection. **International Journal of Cancer**, [s.l.], v. 125, n. 8, p.1902-1911, 15 out. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24579>.

DE VILLIERS, E *et al.* Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p.17-27, jun. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>.

DI FIORE, R *et al.* RB1 in cancer: Different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 8, p.1676-1687, 18 abr. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.24329>.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v. 110, n. 5, p.525-541, maio 2006. Portland Press Ltd. <http://dx.doi.org/10.1042/cs20050369>.

DOORBAR J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. **Dis Markers**, v. 23, n. 4, p. 297-313, 2007.

DOORBAR, J *et al.* The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p. F55-F70, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>.

DOORBAR, J *et al.* Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, p.2-23, mar. 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.1822>.

EGAWA, N *et al.* Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. **Viruses**, v. 7, n. 7, p.3863-3890, 16 jul. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v7072802>.

ERICKSON, B *et al.* Human papillomavirus: what every provider should know. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 208, n. 3, p.169-175, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2012.09.007>.

FERLAY, J *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 9 out. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29210>.

FERLAY J *et al.* (2018). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**. IARC, 2018. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>, acessado em [19 dez. 2018].

FERRAZ, M G M C *et al.* 100% rapid rescreening for quality assurance in a quality control program in a public health cytologic laboratory. **Acta Cytologica**, Chicago, v. 49, n. 6, p. 639-643, 2005.

FORMAN, D *et al.* Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. **Vaccine**, v. 30, p. F12-F23, nov. 2012. Elsevier BV. doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.055.

FREITAS, A C; COIMBRA, E C; LEITÃO, M C G. Molecular targets of HPV oncoproteins: Potential biomarkers for cervical carcinogenesis. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Reviews on Cancer**, [s.l.], v. 1845, n. 2, p.91-103, abr. 2014. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.12.004.

GALGANO, M T *et al.* Using Biomarkers as Objective Standards in the Diagnosis of Cervical Biopsies. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 34, n. 8, p.1077-1087, ago. 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1097/pas.0b013e3181e8b2c4.

GANGULY N; PARIHAR S P. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. **J. Biosci**, v. 34, p. 113-123. PMID: 19430123.

GATTA, L B *et al.* Diagnostic Implications of L1, p16, and Ki-67 Proteins and HPV DNA in Low-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 30, n. 6, p.597-604, nov. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1097/pgp.0b013e31821ac4fd.

GHITTONI, R *et al.* The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. **Virus Genes**, v. 40, n. 1, p.1-13, 17 out. 2009. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1007/s11262-009-0412-8. GIACINTI, C; GIORDANO A. RB and cell cycle progression. **Oncogene**, v. 25, n. 38, p.5220-5227, 28 ago. 2006. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1209615.

GOEL, M; MEHROTRA, A. Immunohistochemical expression of MIB-1 and PCNA in precancerous and cancerous lesions of uterine cervix. **Indian Journal of Cancer**, v. 50, n. 3, p.200-205, 2013. Medknow. http://dx.doi.org/10.4103/0019-509x.118729.

GRADÍSSIMO, A; BURK, R D. Molecular tests potentially improving HPV screening and genotyping for cervical cancer prevention. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 17, n. 4, p.379-391, 20 fev. 2017. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1080/14737159.2017.1293525.

GRAHAM, S V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. **Clinical Science**, [s.l.], v. 131, n. 17, p.2201-2221, 10 ago. 2017. Portland Press Ltd. <http://dx.doi.org/10.1042/cs20160786>.

GROVES, I J; COLEMAN, N. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. **The Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 235, n. 4, p.527-538, 20 jan. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/path.4496>.

GUPTA, S; KUMAR, P; DAS, B C. HPV: Molecular pathways and targets. **Current Problems in Cancer**, v. 42, n. 2, p.161-174, mar. 2018. Elsevier BV.

HÄFNER, N *et al.* Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. **Oncogene**, [s.l.], v. 27, n. 11, p.1610-1617, 10 set. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210791>.

HARDEN, M E.; MUNGER, K. Human papillomavirus molecular biology. **Mutation Research/reviews in Mutation Research**, [s.l.], v. 772, p.3-12, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.07.002>.

HARIRI J, OSTER A. The negative predictive value of p16INK4a to assess the outcome of cervical intraepithelial neoplasia 1 in the uterine cervix. **Int J Gynecol Pathol** 2007;26:223–8.

HERBERT, A.; ARBYN, M.; BERGERON, C. Why CIN3 and CIN2 should be distinguished on histological reports. **Cytopathology**, v. 19, n. 1, p.63-64, 15 jan. 2008. Wiley-Blackwell.

HIEBERT, S W *et al.* The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. **Genes & Development**, v. 6, n. 2, p.177-185, 1 fev. 1992. Cold Spring Harbor Laboratory Press. [doi.org/10.1101/gad.6.2.177](http://dx.doi.org/10.1101/gad.6.2.177).

HILFRICH, R.; HARIRI J. Prognostic relevance of HPV L1 capsid protein detection within mild to moderate dysplastic lesions of the cervix uteri in combination with a second biomarker p16, **Anal Quant Cytol Histl**, v. 30, n 2, p. 78-82. Apr. 2008.

HONG, D *et al.* Viral E6 is overexpressed via high viral load in invasive cervical cancer with episomal HPV16. **Bmc Cancer**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.1-8, 15 fev. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-017-3124-9>.

HWANG, S J.; SHROYER, K R. Biomarkers of Cervical Dysplasia and Carcinoma. **Journal of Oncology**, [s.l.], v. 2012, p.1-9, 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/507286>.

INCA. **Manual de Gestão da Qualidade para Laboratório de Citopatologia/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, - 2. ed. - Rio de Janeiro : INCA, 2016. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/livro_completo_manual_citopatologia.pdf, acessado em [janeiro de 2018].

INCA. **Nomenclatura brasileira para laudos citopatológicos cervicais/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, - 3. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2012. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/nomenclatura_laudo_cervical.pdf, acessado em [janeiro de 2018]

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde: 104 p. 2011. acessado em [janeiro de 2018]

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2018 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde 2017. acessado em [outubro de 2018].

IZADI-MOOD, N *et al.* Immunohistochemical expression of p16 and HPV L1 capsid proteins as predictive markers in cervical lesions. **Archives of Gynecology And Obstetrics**, [s.l.], v. 289, n. 6, p.1287-1292, 18 dez. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00404-013-3124-1>.

KIM, T H *et al.* Clinical Implication of p16, Ki-67, and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Cervical Neoplasia: Improvement of Diagnostic Accuracy for High-grade Squamous Intraepithelial Lesion and Prediction of Resection Margin Involvement on Conization Specimen. **Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 1, p.70-77, 30 mar. 2015. Korean Society of Cancer Prevention. <http://dx.doi.org/10.15430/jcp.2015.20.1.70>.

KLAES R, *et al.* p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. **Am J Surg Pathol**, v. 26, n. 11, p. 1389-99, nov 2002.

KORI, Medi; ARGHA, Kazim Yalcin. Potential biomarkers and therapeutic targets in cervical cancer: Insights from the meta-analysis of transcriptomics data within network biomedicine perspective. **Plos One**, [s.l.], v. 13, n. 7, p.1-27, 18 jul. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0200717>.

KHOURY, J.D. *et al.* Landscape of DNA virus associations across human malignant cancers: analysis of 3,775 cases using RNA-Seq. **J. Virol.** 87 (16), 8916–8926. 2013. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00340-13>. (Epub 2013/06/07. PubMed PMID: 23740984; PubMed Central PMCID: PMC3754044).

LAMBERT, A P F; ANSCHAU, F; SCHMITT, V M. P16INK4A expression in cervical premalignant and malignant lesions. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 80, n. 2, p.192-196, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2005.08.005>.

MARTIN, C M; O'LEARY, J J. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, v.25, n. 5, p.605-15, 2011.

MCBRIDE, A A. Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. **Biological Chemistry**, [s.l.], v. 398, n. 8, p.919-927, 1 jan. 2017. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/hsz-2017-0113>.

MITILDZANS, A *et al.* Expression of p63, p53 and ki-67 in patients with cervical intraepithelial neoplasia. **Turkish Journal of Pathology**, [s.l.], p.9-16, 2016. Federation of Turkish Pathology Societies. <http://dx.doi.org/10.5146/tjpath.2016.01373>.

MOODY, C A.; LAIMINS, L A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 10, n. 8, p.550-560, 1 jul. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2886>.

MOODY, C. Mechanisms by which HPV Induces a Replication Competent Environment in Differentiating Keratinocytes. **Viruses**, [s.l.], v. 9, n. 9, p.1-21, 19 set. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v9090261>.

MUÑOZ, N *et al.* The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: A population-based case-control study in colombia and spain. **International Journal of Cancer**, v. 52, n. 5, p.743-749, 11 nov. 1992. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.2910520513>.

MURILLO, R *et al.* Cervical cancer in Central and South America: Burden of disease and status of disease control. **Cancer Epidemiology**, v. 44, p. S121-S130, 2016.

NAM, E J *et al.* The expressions of the Rb pathway in cervical intraepithelial neoplasia; predictive and prognostic significance. **Gynecologic Oncology**, v. 104, n. 1, p.207-211, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.07.043>.

NAM, E J *et al.* Expression of the p16INK4a and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. **Journal of Gynecologic Oncology**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.162-168, 2008. Asian Society of Gynecologic Oncology; Korean Society of Gynecologic Oncology and Colposcopy (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.3802/jgo.2008.19.3.162>.

NAM, K. Colposcopy at a turning point. **Obstetrics & Gynecology Science**, v. 61, n. 1, p.1-6, 2018. Korean Society of Obstetrics and Gynecology (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.5468/ogs.2018.61.1.1>.

NARISAWA-SAITO, M; KIYONO, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Science**, v. 98, n. 10, p.1505-1511, out. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00546.x>.

NUOVO, G J *et al.* New biomarkers of human papillomavirus infection in acute cervical intraepithelial neoplasia. **Annals of Diagnostic Pathology**, [s.l.], v. 36, p.21-27, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2018.06.008>.

OJESINA, A I, *et al.* Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. **Nature**. 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12881>. (Epub 2014/01/07. PubMed PMID:24390348).

OVESTAD, I T *et al.* The impact of epithelial biomarkers, local immune response and human papillomavirus genotype in the regression of cervical intraepithelial neoplasia

grades 2-3. **Journal of Clinical Pathology**, v. 64, n. 4, p.303-307, 18 mar. 2011. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2010.083626>.

OVESTAD, I T *et al.* Clinical value of fully automated p16/Ki-67 dual staining in the triage of HPV-positive women in the Norwegian Cervical Cancer Screening Program. **Cancer Cytopathology**, v. 125, n. 4, p.283-291, 5 dez. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/cncy.21807>.

OYERVIDES-MUÑOZ, M A *et al.* Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. **Infection, Genetics and Evolution**, [s.l.], v. 61, p.134-144, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2018.03.003>.

OZAKI, S; ZEN, Y; INOUE, M. Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: potential progression predictive factors for low-grade lesions. **Human Pathology**, v. 42, n. 7, p.1007-1012, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2010.10.021>.

PAJTLER, M *et al.* Rapid cervicovaginal smear screening: method of quality control and assessing individual cytotechnologist performance. **Cytopathology**, v. 17, n. 3, p.121-126, jun. 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2303.2006.00367.x>.

PARFENOV, M *et al.* Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 111 (43), 15544–15549. 2014. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1416074111>. (Epub 2014/10/15. PubMed PMID: 25313082; PubMed Central PMCID: PMC4217452).

PARK, W S *et al.* Human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas in korea: Use of G1 cycle markers as new prognosticators. **Head & Neck**, [s.l.], v. 34, n. 10, p.1408-1417, 2 nov. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hed.21939>.

PIM, D *et al.* Human papillomaviruses and the specificity of PDZ domain targeting. **The Febs Journal**, [s.l.], v. 279, n. 19, p.3530-3537, 29 ago. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08709.x>.

PINTO, A P *et al.* Immunomarkers in Gynecologic Cytology: The Search for the Ideal ‘Biomolecular Papanicolaou Test’. **Acta Cytologica**, v. 56, n. 2, p.109-121, 2012. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000335065>.

PITOL, B C V. **Análise da Expressão das Proteínas p16, p53 e L1/HPV nas Lesões Intraepiteliais Cervicais**. 2012. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.

PITTOLI, J E *et al.* Revisão de esfregaços cervicais negativos em pacientes com lesões intra-epiteliais de alto grau. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 219-221, 2003.

POLJAK, M *et al.* Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update. **Journal of Clinical Virology**, v. 76, p. S3-S13, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.10.023>.

PORTARI, E A *et al.* Immunohistochemical Expression of Cyclin D1, p16Ink4a, p21WAF1, and Ki-67 Correlates With the Severity of Cervical Neoplasia. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 32, n. 5, p.501-508, set. 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/pgp.0b013e31826f5cf6>.

RAHIMI, S *et al.* Endocervicoscopy and Biopsy to Detect Cervical Intraepithelial Squamous Neoplasia in Nonvisible Squamocolumnar Junction With Unsatisfactory Colposcopy: A Pilot Study. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 17, p.1-6, jan. 2018. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1533034617753811>.

RAMIREZ, N *et al.* Expressions of E2 and E7-HPV16 proteins in pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 90, n. 8, p.573-580, 8 jun. 2015. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.3109/10520295.2015.1047794>.

RENSHAW, A A. An accurate and precise methodology for routine determination of the false-negative rate of Papanicolaou smear screening. **Cancer (Cancer Cytopathology)**, Philadelphia, v. 93, n. 2, p. 86-92, 2001.

REUSCHENBACH, M *et al.* P16INK4a Immunohistochemistry in Cervical Biopsy Specimens: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Interobserver Agreement. **American Journal of Clinical Pathology**, [s.l.], v. 142, n. 6, p.767-772, 11 nov. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1309/ajcp3tphv4trizek>.

RONCAGLIA, M T *et al.* Characterization of p16 and E6 HPV-related proteins in uterine cervix high-grade lesions of patients treated by conization with large loop excision. **Oncology Letters**, v. 6, n. 1, p.63-68, 20 maio 2013. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2013.1356>.

SAHASRABUDDHE, V V; LUHN, P; WENTZENSEN, N. Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts. **Future Microbiology**, v. 6, n. 9, p.1083-1098, set. 2011. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.11.87>.

SARWATH, H *et al.* Introduction of p16INK4a as a surrogate biomarker for HPV in women with invasive cervical cancer in Sudan. **Infectious Agents and Cancer**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.1-8, 30 set. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13027-017-0159-0>.

SCHIFFMAN, M *et al.* Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer. **Jnci Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 5, p.368-383, 31 jan. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djq562>.

SCHIFFMAN, M *et al.* Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, [s.l.], v. 2, p.1-20, 1 dez. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.86>.

SCHIFFMAN, M; WENTZENSEN, N. Human Papillomavirus Infection and the Multistage Carcinogenesis of Cervical Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.553-560, 1 abr. 2013. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.epi-12-1406>.

SCHAFER, K A. The cell cycle: a review. Review article. *Vet Pathol*, v.35, p.461 - 478, 1998.

SCHOLZEN, T; GERDES, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. **J. Cell. Physiol.**, v. 182, p. 311–322, 2000. [http://dx.doi:10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9](http://dx.doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9).

SELLORS, J W; SANKARANARAYANAN, R. Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Beginners' Manual. **Lyon: International Agency for Research on Cancer**, 2003.

SHAIN, A F *et al.* Utility of p16 Immunohistochemistry in Evaluating Negative Cervical Biopsies Following High-risk Pap Test Results. **The American Journal of Surgical Pathology**, p.69-75, nov. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/pas.0000000000000960>.

SHUKLA, S A. Study on the Nucleolar Organizer Regions-As a Tumour Proliferative Marker in Cervical Smears. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, p.278-283, 2013. JCDR Research and Publications. <http://dx.doi.org/10.7860/jcdr/2013/4808.2746>.

SIDERI, M *et al.* Accuracy of Colposcopically Directed Biopsy: Results from an Online Quality Assurance Programme for Colposcopy in a Population-Based Cervical Screening Setting in Italy. **Biomed Research International**, v. 2015, p.1-6, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/614035>.

SILVA, D C *et al.* Immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and p53 in cervical lesions – A systematic review. **Pathology - Research and Practice**, [s.l.], v. 213, n. 7, p.723-729, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2017.03.003>.

SILVA, N N T. **Polimorfismo C677t no Gene da Enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase e o Risco de Desenvolvimento do Câncer Cervical**. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.

SON, S *et al.* Evaluation of p16INK4a, pRb, p53 and Ki-67 expression in cervical squamous neoplasia. **Journal of Biomedical Research**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.209-217, 30 set. 2012. Research Institute of Veterinary Medicine. <http://dx.doi.org/10.12729/jbr.2012.13.3.209>.

STEENBERGEN, R D M *et al.* Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 14, n. 6, p.395-405, jun. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3728>.

STOLER M H, AUSTIN R M, ZHAO C. Point-Counterpoint: Cervical Cancer Screening Should Be Done by Primary Human Papillomavirus Testing with Genotyping and Reflex Cytology for Women over the Age of 25 Years. **J Clin Microbiol**. 2015; 53:2798–2804. [PubMed: 25948606]

SUN, M *et al.* Meta-analysis on the performance of p16/Ki-67 dual immunostaining in detecting high-grade cervical intraepithelial neoplasm. *J Can Res Ther* 2018;14:S587-93.

THOMAS, J T; LAIMINS, L A. Human Papillomavirus Oncoproteins E6 and E7 Independently Abrogate the Mitotic Spindle Checkpoint. **Journal of Virology**, v. 72, n. 2, p.1131-1137, fev. 1998.

TOMAIĆ, V. Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites. **Cancers**, v. 8, n. 10, p.1-22, 19 out. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers8100095>.

TORRE, L A *et al.* Global cancer statistics, 2012. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p.87-108, 4 fev. 2015. American Cancer Society. [doi.org/10.3322/caac.21262](http://dx.doi.org/10.3322/caac.21262).

TORNESELLO, M L *et al.* Viral and Cellular Biomarkers in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cancer. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2013, p.1-10, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/519619>.

TRINGLER, B *et al.* Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. **Human Pathology**, v. 35, n. 6, p.689-696, jun. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2004.02.012>.

UIJTERWAAL, M H *et al.* Triaging HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: Baseline and longitudinal data. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 136, n. 10, p.2361-2368, 6 nov. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29290>.

VALENTI, G *et al.* Tumor markers of uterine cervical cancer: a new scenario to guide surgical practice?. **Updates In Surgery**, [s.l.], v. 69, n. 4, p.441-449, 16 set. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13304-017-0491-3>.

VAN BAARS, R *et al.* Investigating Diagnostic Problems of CIN1 and CIN2 Associated With High-risk HPV by Combining the Novel Molecular Biomarker PanHPVE4 With P16INK4a. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 39, n. 11, p.1518-1528, nov. 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/pas.0000000000000498>.

VAN ZUMMEREN, M *et al.* Three-tiered score for Ki-67 and p16ink4a improves accuracy and reproducibility of grading CIN lesions. **Journal of Clinical Pathology**, [s.l.], v. 71, n. 11, p.981-988, 16 jul. 2018. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2018-205271>.

VASSALLO, J *et al.* High risk HPV and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet.*, v.71(1), p.45-8, 2000.

WANG, J *et al.* p16INK4A, p14ARF, p53, and PCNA in Cervical Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 1, p.2407–2414, abril 2004.

WENTZENSEN, N *et al.* Performance of p16/Ki-67 Immunostaining to Detect Cervical Cancer Precursors in a Colposcopy Referral Population. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 15, p.4154-4162, 6 jun. 2012. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-12-0270>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). International Agency for Research on Cancer. Globocan 2008. Lyon, 2008. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>>. Acessado em [15 set. 2017].

XING, Y; WANG, C; WU, J. Expression of geminin, p16, and Ki67 in cervical intraepithelial neoplasm and normal tissues. **Medicine**, v. 96, n. 26, p.1-5, jun. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/md.00000000000007302>.

XUE, Y *et al.* Loss of HPV16 E2 protein expression without disruption of the E2 ORF correlates with carcinogenic progression. **Open Virol J** 6, 163–172. 2012.<http://dx.doi.org/10.2174/1874357901206010163>. (Epub 2013/01/24. PubMed PMID: 23341852; PubMed Central PMCID: PMC3547325).

YOSHIDA, T *et al.* Immunochemical analysis of HPV L1 capsid protein and p16 protein in liquid-based cytology samples from uterine cervical lesions. **Cancer**, v.114(2), p.83-8, 2008.

YU, L *et al.* Clinical evaluation of human papillomavirus 16/18 oncoprotein test for cervical cancer screening and HPV positive women triage. **International Journal of Cancer**, [s.l.], p.1-24, 30 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.31368>.

ZAPPACOSTA, R *et al.* Chromogenic In Situ Hybridization and p16/Ki67 Dual Staining on Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Cervical Specimens: Correlation with HPV-DNA Test, E6/E7 mRNA Test, and Potential Clinical Applications. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2013, p.1-11, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/453606>.

ZHANG, G; YANG, B; ABDUL-KARIM, F W. P16 Immunohistochemistry is Useful in Confirming High-grade Squamous Intraepithelial Lesions (HSIL) in Women With Negative HPV Testing. **International Journal of Gynecological Pathology**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.180-186, mar. 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/pgp.0000000000000112>.

ZHANG, X; SHEN, D. p16INK4a and Ki-67 measurement predict progression of cervical low-grade squamous intraepithelial lesion. **Int J Clin Exp Pathol** 2018;11(8):4109-4116. www.ijcep.com /ISSN:1936-2625/IJCEP0078929.

ZHONG, P *et al.* p16 and Ki-67 expression improves the diagnostic accuracy of cervical lesions but not predict persistent high risk human papillomavirus infection with CIN1. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 3, n. 8, p.2979-2986, mar. 2015.


ZHOU, R *et al.* The prognostic value of p53 expression for patients with cervical cancer: a meta analysis. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**, [s.l.], v. 195, p.210-213, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2015.10.006>.

ZUR HAUSEN, H *et al.* Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. **Int J Cancer**, v.13(5), p.650-6, 1974.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p.342-350, 1 maio 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc798>.

9) ANEXOS

Anexo 1

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div> UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO </div> <div>  </div> </div>																
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP																
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ONCOPROTEÍNAS DO HPV, DE PROTEÍNAS DO CICLO CELULAR E DE MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO NAS LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE INVASOR Pesquisador: Angélica Alves Lima Área Temática: Versão: 3 CAAE: 79261617.6.0000.5150 Instituição Proponente: Universidade Federal de Ouro Preto Patrocinador Principal: Financiamento Próprio																
DADOS DO PARECER Número do Parecer: 2.460.152 Apresentação do Projeto: <p>"O câncer cervical ou do colo do útero é uma das mais frequentes patologias que acomete a população feminina. Há evidente associação entre o Papilomavirus Humano (HPV) e as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino. O principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical é a infecção persistente pelo HPV que pode levar a transformações progressivas com possível evolução para lesões intraepiteliais precursoras do câncer do colo do útero. Essas lesões se não diagnosticadas e tratadas oportunamente evoluem para o câncer. O mecanismo pelo qual o HPV interfere no ciclo celular levando a desregulação e progressão da lesão inclui fatores inerentes ao vírus e à sua inter-relação com a célula hospedeira. Estas interferências podem levar a indicação de marcadores úteis no prognóstico e no diagnóstico da patologia. Este trabalho é a continuidade do projeto "Análise de Marcadores Bioquímicos e Genéticos nas Lesões Intraepiteliais Cervicais" anteriormente aprovado pelo CEP/UFOP, CAAE - 0022.0.238.000-10. O objetivo deste trabalho é analisar a distribuição e a expressão de oncoproteínas do HPV, proteínas regulatórias do ciclo celular e marcadores de proliferação nas Lesões Intraepiteliais Cervicais e no Carcinoma Epidermoide Invasor, buscando marcadores que auxiliem no diagnóstico e prognóstico das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da cérvix uterina. Serão avaliadas 150 amostras de biópsias cervicais distribuídas de acordo com o diagnóstico histopatológico em Cervicite (LB), Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) de graus 1, 2 e 3 e Carcinoma Epidermoide Invasor (CEI). As análises de</p>																
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td colspan="4">Endereço: Morro do Cruzeiro-ICEB II, Sala 29 -PROPP/UFOP</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Bairro: Campus Universitário</td> <td colspan="2">CEP: 35.400-000</td> </tr> <tr> <td>UF: MG</td> <td colspan="3">Município: OURO PRETO</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (31)3559-1368</td> <td>Fax: (31)3559-1370</td> <td colspan="2">E-mail: cep@propp.ufop.br</td> </tr> </table>	Endereço: Morro do Cruzeiro-ICEB II, Sala 29 -PROPP/UFOP				Bairro: Campus Universitário		CEP: 35.400-000		UF: MG	Município: OURO PRETO			Telefone: (31)3559-1368	Fax: (31)3559-1370	E-mail: cep@propp.ufop.br	
Endereço: Morro do Cruzeiro-ICEB II, Sala 29 -PROPP/UFOP																
Bairro: Campus Universitário		CEP: 35.400-000														
UF: MG	Município: OURO PRETO															
Telefone: (31)3559-1368	Fax: (31)3559-1370	E-mail: cep@propp.ufop.br														

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
OURO PRETO



Continuação do Parecer: 2.480.152

expressão de proteínas serão realizadas pela técnica de imunistoquímica e será feita a tipagem do HPV pela metodologia de PCR em Tempo Real. As análises estatísticas serão realizadas no software SPSS versão 17.0."

Objetivo da Pesquisa:

"Analisar a distribuição e a expressão de oncoproteínas do HPV, proteínas regulatórias do ciclo celular e marcadores de proliferação nas Lesões Intraepiteliais Cervicais e no Carcinoma Epidermoide Invasor, buscando marcadores que auxiliem no diagnóstico e prognóstico das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da cérvix uterina."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Riscos:

As amostras deste trabalho são blocos de biópsia que estavam armazenados nos arquivos do Laboratório Tafuri. Portanto, não haverá nenhum contato com pacientes ou seus familiares. As amostras já estão com os pesquisadores, pois outras análises já foram realizadas no mesmo material em um projeto anteriormente aprovado pelo CEP/UFOP (CAAE - 022.0.238.000-10). Neste projeto não serão coletados nem utilizados dados das pacientes, apenas o material biológico dos blocos de biópsias. Portanto, não foram previstos riscos diretos às pacientes que forneceram material biológico.

Benefícios:

Os benefícios da realização deste estudo estão relacionados a possibilidade de se encontrar biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico e prognóstico das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da cérvix uterina."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados e adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Morro do Cruzeiro-ICEB II, Sala 29 -PROPP/UFOP			
Bairro: Campus Universitário	CEP: 35.400-000		
UF: MG	Município: OURO PRETO		
Telefone: (31)3559-1368	Fax: (31)3559-1370	E-mail: cep@propp.ufop.br	

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO



Continuação do Parecer: 2.460.152

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1017692.pdf	04/01/2018 08:05:00		Aceito
Outros	Declaracao_custos.pdf	28/11/2017 12:52:09	Angélica Alves Lima	Aceito
Outros	Anuencia_LT.jpg	28/11/2017 12:50:31	Angélica Alves Lima	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	23/10/2017 09:30:36	Angélica Alves Lima	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	20/10/2017 21:55:12	Angélica Alves Lima	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.pdf	20/10/2017 21:54:41	Angélica Alves Lima	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

OURO PRETO, 04 de Janeiro de 2018

Assinado por:
Núncio Antônio Araújo Sól
(Coordenador)

Endereço: Morro do Cruzeiro-ICEB II, Sala 29 -PROPP/UFOP
 Bairro: Campus Universitário CEP: 35.400-000
 UF: MG Município: OURO PRETO
 Telefone: (31)3559-1368 Fax: (31)3559-1370 E-mail: cep@propp.ufop.br

Anexo 2**Protocolo de desparafinização**

Solução	Tempo (min)
Xilol I	30
Xilol II	30
Xilol + Álcool 100° I	30
Xilol + Álcool 100° II	5
Álcool 100°	5
Álcool 95°	5
Álcool 70°	5
Água destilada	5

Observação: procedimento realizado a temperatura ambiente.

Anexo 3

Conceitos e cálculos de sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes imunoistoquímicos

Observação:

- O diagnóstico histopatológico foi considerado como padrão-ouro

1) Sensibilidade (s): é a probabilidade de um indivíduo avaliado e doente de ter seu teste alterado (positivo). Número de indivíduos doentes e com teste positivo/número total de indivíduos doentes;

$$s = \frac{VP}{VP + FN}$$

2) Especificidade (e): é a probabilidade de um indivíduo avaliado e normal ter seu teste normal (negativo). Número de indivíduos normais e com teste negativo/número total de indivíduos normais;

$$e = \frac{VN}{VN + FP}$$

3) Acurácia (a): proporção de testes verdadeiramente positivos e verdadeiramente negativos, em relação à totalidade dos resultados. É uma medida da correlação entre o valor estimado e os valores reais, ou seja, mede o quanto a estimativa obtida é relacionada com o “valor real” do parâmetro;

$$a = \frac{VP + VN}{VP + FP + FN + VN}$$